VERGLEICHENDE STUDIE ZUR PHAGOZYTOSELEISTUNG HUMANER GRANULOZYTEN MIT EINER MAKRO- UND MIKROMETHODE

Ingrid A. Hagn

Diss
München
1984

Aus der Kinder-Poliklinik der Ludwig Maximilians-
Universität München
Direktor: Prof. Dr. H. Spiess

VERGLEICHENDE STUDIE ZUR PHAGOZYTOSELEISTUNG HUMANER GRANULOZYTEN MIT EINER MAKRO- UND MIKROMETHODE+

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin verfaßt von einer hohen Medizinischen Fakultät der Ludwig Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von

Ingrid A. Hagn
aus Schirmitz

1983

+Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Ty 1/2)

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Spiess
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	7.6.1984

Meinen Eltern

und

meiner Tochter Julia, die unwiederbringliche Stunden der Wissenschaft opferte.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544309_0026

"Vielleicht liegt die wichtigste Funktion der vielgeschmähten wissenschaftlichen Arbeit zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin für die jungen Kollegen darin, einmal selbst die systematischen Fehler bei der Ermittlung von Daten, ihrer Berechnung und Bewertung erlebt zu haben."
(R. GROSS: Medizinische Diagnostik - Grundlagen und Praxis. Springer, Berlin Heidelberg New York, 76 (1969)).

Daß die vorliegende Dissertation trotz solcher "Erlebnisse" entstehen konnte, verdanke ich vor allem der umfassenden Förderung durch meinen Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. K.-D. Tympner.

Weiterhin habe ich unter all den anderen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere zu danken:
Herrn Dr. med. P.K. Klose für seine bereitwillige Hilfe und wertvollen Anregungen; Herrn Prof. Dr. R.B. Pelka und Herrn Dipl.-Inf. P. Dirschedl für die Lösung statistischer Fragen; Herrn Priv.Doz. Dr. med. C.E. Pilars de Pilar für die Durchsicht des Manuskripts, seine konstruktiven Verbesserungsvorschläge sowie die wertvollen Diskussionen, die ich mit ihm führen durfte.

Ganz besonders herzlich möchte ich Frau E. Hüftlein danken, die mir mit gutem Rat und vielen Anregungen zur Seite stand und deren praktische Erfahrung mir bei der Durchführung der Untersuchungen eine große Hilfestellung war.

Mein Dank gilt auch allen Kindern und Erwachsenen, die für die Untersuchungen ihr Blut zur Verfügung stellten sowie nicht zuletzt der Firma BIOTEST für sachliche und personelle Unterstützung.

INHALTSVERZEICHNIS

Kapitel		Seite
	Liste der Abkürzungen	
1.	EINLEITUNG	1
1.1	Historisch	1
1.2	Physiologie	2
1.2.1	Der Granulozyt	2
1.2.2	Funktion des Granulozyten	3
1.2.3	Biochemische Veränderungen	6
1.3	Methoden zur Untersuchung der Phagozytose	7
2.	VORÜBERLEGUNGEN	10
2.1	Zur Problematik der Phagozytose-messung	10
2.2	Wahl der Partikel	11
2.3	Wahl der Inkubationszeiten	13
2.4	Auswahl der Probanden	13
3.	STATISTIK	14
4.	METHODIK	15
4.1	Makrotest	15
4.1.1	Herstellung der Lösungen	16
4.1.1.1	Herstellung der Dextranlösung	16
4.1.1.2	Herstellung der Partikel-suspension	16
4.1.1.3	Herstellung des Poolserums	16
4.1.1.4	Herstellung des Eigenserums	17
4.1.1.5	Herstellung der Leukozyten-suspension	17
4.1.2	Durchführung des Makrotests	18
4.1.2.1	Blutentnahme	18
4.1.2.2	Testansatz	18
4.1.2.3	Berechnung des Phagozytoseindex	18

Kapitel		Seite
4.2	Mikrotest	21
4.2.1	Herstellung der Lösungen	22
4.2.1.1	Herstellung der Partikel-suspension	22
4.2.1.2	Herstellung des Poolserums	22
4.2.1.3	Herstellung des Eigenserums	22
4.2.2	Durchführung des Mikrotests	22
4.2.2.1	Blutentnahme	22
4.2.2.2	Isolierung der Granulozyten	22
4.2.2.3	Testansatz	23
4.2.2.4	Berechnung des Phagozytoseindex	23
5.	MATERIAL	24
5.1	Makrotest	24
5.2	Mikrotest	24
6.	VERSUCHE UND ERGEBNISSE	25
6.1	Untersuchungen zum Makrotest	25
6.1.1	Einfluß eines rotierenden Systems auf die Phagozytose	25
6.1.2	Einfluß einer definierten Granulo-zyteneinstellung auf den Phago-zytoseindex	27
6.2	Untersuchungen zum Mikrotest	30
6.2.1	Einfluß tageszeitlich bedingter Schwankungen auf die Phagozytose	30
6.2.2	Einfluß der Nahrungsmittelauf-nahme auf die Phagozytose	32
6.2.3	Einfluß der Inkubationszeit auf die Phagozytose	34
6.2.4	Einfluß einer definierten Par-tikelkonzentration auf die Phagozytose	37
6.3	Vergleichende Messungen mit der Makro- und Mikromethode	40
6.3.1	Einfluß der Serumverdünnung auf die Phagozytose im Makro- und Mikrotest	40

Kapitel		Seite
6.3.2	Makrotest - Mikrotest Prüfung auf Korrelation und vergleichende Beurteilung der einzelnen Parameter	46
6.3.2.1	Vergleich der PI-Werte im Makro- und Mikrotest	46
6.3.2.2	Korrelationsstatistische Analyse anhand einer linearen Regressionsgeraden	51
6.3.2.2.1	Vergleich Makro Min./Mikro Min. für Poolserum	51
6.3.2.2.2	Vergleich Makro Min./Mikro Min. für Eigenserum	51
6.3.2.2.3	Vergleich Makro Max./Mikro Max. für Poolserum	51
6.3.2.2.4	Vergleich Makro Max./Mikro Max. für Eigenserum	51
6.3.2.3	Hypothesenprüfung charakteristischer Veränderlicher, die mit dem PI in Verbindung stehen	57
6.3.2.3.1	Hypothese: Das Geschlecht beeinflußt die Phagozytose nicht	57
6.3.2.3.2	Hypothese: Das Älter ab 1. LJ beeinflußt die Phagozytose nicht	57
6.3.2.4	Laborbefunde	59
7.	DISKUSSION	62
7.1	Diskussion der Makromethode	62
7.2	Diskussion der Mikromethode	65
7.3	Diskussion Makrotest/Mikrotest im Vergleich	71
8.	ZUSAMMENFASSUNG	77
9.	LITERATURVERZEICHNIS	79
	LEBENSLAUF	88

LISTE DER ABKÜRZUNGEN

RES	Retikuloendotheliales System
HWZ	Halbwertszeit
ATP	Adenosin-5-triphosphat
Glucose-6-P	Glukose-6-Phosphat
Glucose-6-P-DH	Glukose-6-Phosphatdehydrogenase
CO_2	Kohlendioxyd
HMS	Hexosemonophosphatshunt
NADH	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid oxydiert
H_2O_2	Wasserstoffperoxyd
EDTA	Äthylendiamin-Tetra-Azetat
NaCl	Natriumchlorid
PI	Phagozytoseindex
PS	Poolserum (Kontrollserum)
ES	Eigenserum

1. EINLEITUNG

1.1 Historisch

Die Fähigkeit lebender Zellen, fremde korpuskuläre Elemente in sich aufzunehmen, wird als Phagozytose bezeichnet. Der Begriff stammt von METSCHNIKOFF (53), der diesen Vorgang 1882 erstmals an Seesternlarven beobachtete. Es handelt sich bei der Phagozytose phylogenetisch um eine der ältesten Abwehrfunktionen, die unter dem Eindruck der Arbeiten METSCHNIKOFFS ein großes experimentelles und klinisches Interesse fand (MUDD et al (57), HAMBURGER (27), BERRY und SPIES (4, 5), WRIGHT und DODD (83), HARRIS (28), DITTRICH (15), WHITE (82), FENN (21, 22) u.a.).

Die zentrale Stellung der neutrophilen Granulozyten bei der Abwehr von Schädigungen des Organismus rückte zunächst durch immunbiologische Forschungen auf serologischem Gebiet in den Hintergrund. Die Untersuchungen von WRIGHT und DOUGLAS (84, 85) sowie NEUFELD und RIMPAU (60) führten den Nachweis, daß Serumfaktoren die Phagozytose beschleunigten. Eine Brücke zur humoralen Abwehr war hergestellt. Sie brachten eine neue intensive Belebung der Forschungsarbeiten, welche ihren Niederschlag in einer umfangreichen Literatur gefunden hat. Die Entwicklung neuer Methoden führte zu Erkenntnissen, die "ohne Übertreibung als wahrer Durchbruch auf dem Gebiet der Phagozytose bezeichnet werden dürfen" (HITZIG (31)).

Für den Kliniker gewannen diese Vorgänge umso mehr an Bedeutung, als einmal die Rolle der Leistung humaner Granulozyten bei der Entstehung von Krankheiten erkannt und zum anderen einfache Untersuchungsmethoden zur Prüfung dieses immunbiologischen Grundvorganges entwickelt wurden.

1.2 Physiologie

Voraussetzung für den ungestörten Ablauf der Phagozytose ist ein intaktes, funktionstüchtiges Knochenmark, das phagozytierende Zellen in ausreichender Menge zur Verfügung stellt. BESSIES (6) gibt an, daß beim gesunden Erwachsenen täglich ca. 15 Milliarden Leukozyten an das periphere Blut abgegeben werden; das wären bei kontinuierlicher Ausschüttung pro Sekunde 120 000 Zellen. Die Zellen, die an der Phagozytose beteiligt sind, gehören zwei Systemen an:
a) Granulozyten und Monozyten (bewegliches System);
b) Gewebsphagozyten des RES.

1.2.1 Der Granulozyt

Er entsteht aus morphologisch nicht identifizierbaren, determinierten Stammzellen. Innerhalb von 10 Tagen reift er über den Myeloblasten, Promyelozyten und Myelozyten zum Stabkernigen und schließlich zum segmentierten Neutrophilen heran. Der lebende Granulozyt ist von polymorpher Gestalt, sein Durchmesser im Ausstrichpräparat beträgt ca. 15 µ. Der Kern zeigt ein dichtes, verklumptes Chromatin und ist in 2 - 4 Segmente unterteilt, Nukleolen sind nicht nachweisbar. Das Zytoplasma enthält nur wenig Ribonukleoproteide und ganz vereinzelt Mitochondrien, der GOLGI-Apparat ist mäßig entwickelt. Eingelagert finden sich feine, 0,2 - 0,6 µ große Granula, die ein wichtiger Bestandteil für die Abtötung von Bakterien und Pilzen sind. Sie enthalten neben der Myeloperoxidase eine größere Anzahl antimikrobieller Substanzen und hydrolytischer Enzyme (u.a. Phagozytin, Lysozym, Histamin).

Die Normalwerte der Granulozyten unterliegen einer breiten Streuung (4.500 - 13.000/mm^3) und zeigen im

Rahmen der raschen Reizantwort des Organismus auf bestimmte Beanspruchungen deutliche Schwankungen. Bekannt sind tageszeitliche Schwankungen, postprandiale Veränderungen, die sog. "Schreileukozytose" bei Kindern, ferner Abhängigkeit von körperlichen Anstrengungen, Rauchen, Menstruationszyklus etc. (Eine genaue Übersicht gibt ENGLAND (18)).

Die HWZ der Granulozyten im Blut beträgt ca. 6-7 h, ihre Überlebenszeit im Gewebe 4-5 Tage (KLEIHAUER (45)). Die Erfüllung der Funktion führt unweigerlich zur Zerstörung der Granulozyten.

1.2.2 Funktion der Granulozyten

Die neutrophilen Granulozyten zeichnen sich durch stärkste Aktivität aus. Ihre Hauptaufgabe besteht darin, durch Spalten in den Gefäßwänden in gefährdetes Gewebe einzuwandern und dort z.B. Bakterien in sich aufzunehmen - zu phagozytieren - und unschädlich zu machen. Im allgemeinen bezeichnet die Phagozytose einen Gesamtbegriff für alle Ereignisse, die mit der Interaktion von Serum, Mikroorganismen und Phagozyten zusammenhängen. Exakt ist darunter nur die Einverleibung des Partikels selber zu verstehen.

Der Vorgang der Phagozytose umfaßt im wesentlichen folgende Schritte (s. Abb. 1):

a) Chemotaxis;
b) Opsonierung;
c) Ingestion (= die eigentliche Phagozytose);
d) intrazelluläre Abtötung;
e) Autolyse (Zelltod).

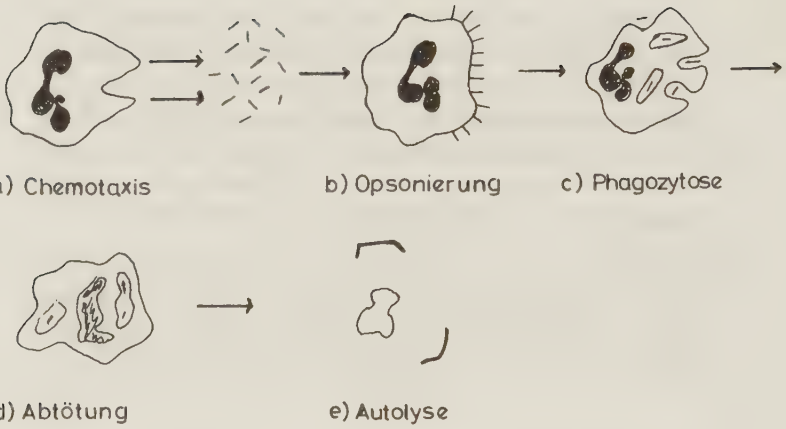


Abb. 1: Phagozytose: wichtigste Teilschritte (modifiziert nach HITZIG, S. 57 (32)

zu a) Chemotaxis

Leukozyten werden durch chemische Reize zur gerichteten Wanderung angeregt. Dieser Prozeß wird von zellulären und humoralen Faktoren beeinflußt (45). Die wichtigsten chemotaktisch wirksamen Stoffe sind nach WARD (80) Anteile des Komplements, Bakteriensubstanzen und Substanzen, die aus der Interaktion zwischen Lymphozyten und Antigenen entstehen.

zu b) Opsonierung

Schon 1902 wies WRIGHT (85) darauf hin, daß Pneumokokken von Leukozyten erst dann phagozytiert werden, wenn sie mit spezifischen Antikörpern bedeckt sind. Erst die so vorbereiteten Partikel sind dem Angriff der Leukozyten zugänglich. Die Serumbestandteile, die mit dem Partikel reagieren, nennt man Opsonine. Die wichtigsten bekannten Opsonine

sind IgG und IgM Antikörper und Komplementbestandteile. Insbesondere dem IgM Antikörper schreibt man eine starke agglutinierende, phagen-neutralisierende, Komplement-bindende und hämolytische Eigenschaft zu (75).

Zu c) Ingestion

Der Fremdkörper wird von Ausläufern der Leukozytenmembran umrundet. Gleichzeitig stülpt sich dieser Teil der Membran nach innen ein und bildet eine Vakuole. STOSSEL et al (70) haben 1976 nachgewiesen, daß bei diesem Vorgang Aktin- und Myosin-Mikrofilamente und das mikrotubuläre System wesentlich beteiligt sind.

Zu d) Intrazelluläre Abtötung

Die in der Phagozytosevakuole eingefangenen Partikel werden nun attackiert, um sie abzutöten und aufzulösen. Dies geschieht einmal durch die sog. Degranulierung (29): Granula verschmelzen mit der Membran der Vakuole und entleeren ihren Inhalt (z.B. proteolytische Enzyme) in das Cavum. Gleichzeitig wird eine Reihe biochemischer Veränderungen ausgelöst, die zur Abtötung der Partikel führen (s. 1.2.3).

Zu e) Autolyse

Im weiteren Verlauf werden die Vakuolen undicht; sie entleeren ihren Inhalt in den Granulozyten, der dadurch zerstört wird = Autolyse.

1.2.3 Biochemische Veränderungen

Die Ingestion ist ein aktiver Prozeß, der Energie benötigt. Zur Einverleibung z.B. einer Polystyren-Partikel ist nach KARNOVSKY (40) die Energie von 10^9 Molekülen ATP notwendig.

Diese Energie wird aus der anaeroben Glykolyse gewonnen, die während der Phagozytose um 20 % steigt (45). Als Endprodukt des Glucose-Metabolismus entsteht Milchsäure, die das pH zur sauren Seite verschiebt und dadurch ebenfalls zur Abtötung beiträgt. Der Abbau verläuft über den sonst als Nebenweg benutzten Hexose-Monophosphat-Shunt (= Oxydation des Glucose-6-P durch die Glucose-6-P-DH ⟶ Pentose und CO_2). Der Ablauf ist abhängig von der angebotenen Glucose und der Glucose-6-P-DH.

Wenige Minuten nach Beginn der Phagozytose steigt der Sauerstoffverbrauch sprunghaft an (respiratory burst) (41). O_2 ist notwendig für den Hexose-Monophosphat-Shunt und die Bildung von H_2O_2 über eine NADH-abhängige Oxydase.

Ein Teil des H_2O_2 perfundiert in die Phagozytose-Vakuole; unter Verwendung eines Halogenions als oxidierbarer Cofaktor führt es zusammen mit der in den Granula befindlichen und von KLEBANOFF 1965 (42) nachgewiesenen Myeloperoxidase zur Abtötung der Bakterien. Insbesondere diese drei Komponenten - H_2O_2, die Myeloperoxidase und das Halogenion - scheinen nach KLEBANOFF bei der Abtötungsfunktion unabdingbar zu sein (43, 44); die genauen mikrobiologischen Vorgänge sind jedoch bis heute noch unklar.

1.3 Methoden zur Untersuchung der Phagozytose

Es ist heute möglich, Störungen im Ablauf der Phagozytose durch verschiedene Tests zu differenzieren. Die gebräuchlichsten Methoden sind in Tab. 1 aufgelistet. Die zahlreichen methodischen Varianten der einzelnen Autoren bedingen allerdings unterschiedliche, z.T. sogar widersprüchliche Ergebnisse, so daß es schwierig ist, größere Vergleiche zu ziehen und verbindliche "Normalwerte" aufzustellen. KLEIHAUER (45) weist darauf hin, daß Angaben über Norm und Normabweichungen zwischen den einzelnen Laboratorien erheblich differieren können.

BRANDT et al (10) haben 1967 einen standardisierten Test entwickelt und damit die Phagozytosekapazität der Granulozyten unter verschiedenen Gesichtspunkten an 41 gesunden erwachsenen Probanden untersucht.

Prinzip

Aus 8-10 ml Heparinblut werden Granulozyten durch Sedimentation isoliert und nach mehrmaligem Waschen in der Bürker Zählkammer auf 5000/mm^3 eingestellt. Aus hitzeinaktivierten Hefezellen wird eine Suspension von 40.000 Partikel/mm^3 hergestellt und bei -50^0 C tiefgefroren. Das Serum wird durch Zentrifugieren bei 500 g für 10 Min. gewonnen.
Gleiche Teile der Leukozytensuspension, der Hefepartikel und des Serums werden bei 37^{0}C 30 Min. inkubiert. Nach Zugabe von 0,1 ml 0,9% EDTA-Lösung in 0,9% NaCl und Zentrifugieren (5 Min. bei 200 g) wird ein Tropfen des Gemisches auf einen Objektträger pipettiert, luftgetrocknet und nach PAPPENHEIM gefärbt. Aus 200 Neutrophilen wird mikroskopisch der Phagozytoseindex nach LEISHMAN (46) ermittelt: Anzahl Keime pro phagozytierenden Leukozyten.

WEHINGER (81) stellte 1976 ein Verfahren vor, das weniger zeit- und materialaufwendig, allerdings auch weniger standardisiert ist. Er hat damit die Phagozytoseleistung der Granulozyten überwiegend an Kindern untersucht.

Prinzip

2 Tropfen Vollblut werden auf einen Objektträger gebracht und 60 Min. bei 37° C in feuchter Kammer inkubiert. Nach Abhebung des Gerinnsels und Spülung mit NaCl bleibt eine dünne Granulozytenschicht zurück. Auf diese wird eine Inkubationsmixtur aus 0,25 ml Pool- bzw. Eigenserum + 0,05 ml Latexsuspension + 0,80 ml NaCl pipettiert und 10 bis 30 Min. (Standard 20 Min.) bei 37° C inkubiert. Anschließend wird die Inkubationsmixtur dekantiert, vorsichtig mit NaCl gespült, in Methanol 1-2 Min. fixiert und mit Kernechtrot (Merck, Darmstadt) gefärbt. Aus 200 Neutrophilen wird mikroskopisch der prozentuale Anteil der Zellen mit mehr als 3 inkorporierten Latexpartikel nach 10, 20 und 30 Minuten ermittelt.

In dieser Arbeit wurde der Versuch unternommen, diese beiden bekannten Verfahren zur Prüfung der Phagozytoseleistung von Granulozyten unter möglichst gleichen Bedingungen zu vergleichen und ihre klinische Anwendbarkeit unter Berücksichtigung der einzelnen Reaktionspartner zu überprüfen.

Tab. 1: Auflistung der wichtigsten Funktionsteste zur quantitativen Bewertung der Granulozyten (modifiziert nach KLEIHAUER, S. 211 (45))

1. In vivo-Untersuchungen		
- In vivo-Clearance virulenter Bakterien aus dem Blutstrom (Tierversuch)		
- Rebucksches Hautfenster	:	Prüfung der Chemotaxis
2. In vitro-Untersuchungen		
- Chemotaxis	:	Erfassung der gezielten Wanderung von Granulozyten in Richtung eines definierten Reizes
- Opsonisation (Opsonischer Index)	:	Verhältnis phagozytierte Bakterien pro Leukozyt im Patientenserum zu phagozytierte Bakterien pro Leukozyt im Normalserum
- Phagozytose		
Ph-Index	:	Bestimmung der Aufnahme von Partikel pro Leukozyt
Ph-Faktor	:	Prozentsatz der phagozytierenden Leukozyten
Phagozytose v. Ölrot-O-Partikel	:	Prüfung des "alternativen Komplementweges"
- Bakterien-Abtötungs-Test ("Bacterial killing test")	:	Bestimmung der Abtötungskapazität gegenüber Bakterien über die im Ansatz überlebenden Keime.
- Nitroblau-Tetrazolium-Test (NBT-Test)	:	Untersuchung der Stimulationsfähigkeit des oxydativen Zellstoffwechsels

2. VORÜBERLEGUNGEN

2.1 Zur Problematik der Phagozytosemessung

Auch bei größter Vorsicht und entsprechender persönlicher Erfahrung ist das Arbeiten mit biologischem Material mit vielen Schwierigkeiten und Unsicherheiten behaftet. Aktive Lebensäußerungen und chemisch-physikalische Kräfte wirken im Gesamtorganismus aufs engste zusammen, und wir wissen nicht, inwieweit in vitro-Untersuchungen diesen gegenseitigen Wechselwirkungen Rechnung tragen können. Dies ist wohl mit eine Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse selbst bei Untersuchungen in den letzten Jahren, für die Erfahrungen vieler Vorgänger zur Verfügung standen.

Dies gilt insbesondere auch für die hier durchgeführte Studie über die Phagozytose neutrophiler Granulozyten, die naturgemäß der Physiologie dieser Zellen unterliegt. Wenn man bedenkt, daß die Granulozyten deutlichen Schwankungen unterliegen, z.B. des Tages und der Nacht, zu denen noch physiologische Vorgänge wie Verdauung, Schlaf, Hunger, neurale und hormonelle Einflüsse kommen, so ist zu erwarten, daß auch bei der Beurteilung der Phagozytoseleistung durch Messung der inkorporierten Partikel in die Zelle starke Schwankungen auftreten.

Abgesehen davon bedeutet die Isolierung der Granulozyten für diese ein großes Trauma. Die bereits im physiologischen Bereich äußerst labilen Zellen reagieren auf Änderungen des Milieus oder mechanische Beanspruchungen sehr empfindlich. BUSSE-GRAWITZ (14) berichtet über den Verlust der Migrationsfähigkeit der Granulozyten durch stärkeres Schütteln des Blutes.

MARTIN et al (52) fanden einen Anstieg der Glykolyse nach Zentrifugieren. Daß Zellschädigungen zu einer grundsätzlichen Änderung des Stoffwechselcharakters führen können, wird von zahlreichen Autoren bestätigt (DITTRICH (15), TULLIS (73), BRÜCKEL u. REMMELE (13), PENNY u. GALTON (62), ESMANN (19), MURPHY (58), u.a.).

Über den Einfluß weiterer exogener Faktoren (Temperatur, pH, Strahlen, Medikamente, Osmolarität, Oberflächenspannung etc.) sei auf die ausführlichen Übersichten von MUDD et al (57) und BERRY u. SPIES (5) verwiesen.

2.2 Wahl der Partikel

Nicht zuletzt die Verwendung verschiedener Partikel ist für die mitunter divergierenden Befunde verantwortlich. BOYDEN et al (9) berichteten 1965 über eine unterschiedliche Phagozytoseleistung von Polystyrenpartikel, Hefezellen und Formalin-fixierten Erythrozyten bei ansonsten gleichen Versuchsbedingungen.

Häufig finden Bakterien Verwendung (57,4,5,83,28,15,u.a.). Für unsere Untersuchungen schienen sie aufgrund bekannter Antigen-Antikörper-Reaktionen wenig geeignet. In der Literatur werden Untersuchungen mit Viren (7,35,17,u.a.), LE-Körperchen (51), Salzen (26,74,79,69), Mineralteilchen wie Kohle (22,26), Quarz (21,1) und Zinnober (38), Wachspartikel (12) und Natriumkristallen (34) beschrieben. In zunehmendem Maß wird die Phagozytose anhand von Latexpartikeln (81,67,78,16,77) und Bäckerhefe (8,9,10, 36,54,59,62,76,86) getestet.

Für die vorliegende Arbeit schien uns in Anlehnung an BRANDT (10) Bäckerhefe (Saccharomyces cerevisiae) am geeignetsten. Die Gründe werden nachfolgend genannt:

a) Bäckerhefe ist leicht erhältlich und kann in beliebiger Konzentration aufbereitet und als Stammlösung oder in gebrauchsfertigen Verdünnungen über lange Zeit bei -20° C aufbewahrt werden.

b) Die Hefepartikel sind im Gegensatz zu Bakterien oder Latexpartikel relativ groß und damit leicht zu zählen. Ihr Durchmesser wird von BRANDT (10) mit 4,4 µ im Mittel angegeben.

c) Nach Untersuchungen von BRANDT (10), die von NEUMANN und KONORZA (59) bestätigt werden, ist die Partikelgröße relativ konstant.

d) Die Hefezellen lassen sich mit den in der Praxis üblichen Färbemethoden leicht anfärben. Durch die hier verwendete PAPPENHEIM-Färbung erhalten sie eine intensive blaue Farbe; sie können leicht von den mehr rötlichen Zellkernen unterschieden werden.

e) Hefepartikel sind nicht pathogen, so daß immunologische Einflüsse auf die Phagozytose vernachlässigbar sind.

f) Eingehende Untersuchungen von BRANDT (10) zeigen, daß die Neigung zur Aggregatbildung in 0,9% NaCl und heparinisiertem Plasma gering ist.

2.3 Wahl der Inkubationszeiten

Die Inkubationszeiten für den Makrotest liegen bei 15 und 45 Min., für den Mikrotest bei 20 und 30 Minuten.

In Anlehnung an die in der Literatur vorgegebene Inkubationsdauer (10,81) haben sich die o.g. Zeiten in einer Reihe von Vorversuchen als optimal erwiesen. Die relativ große Differenz von 15 Min. beim Vergleich der beiden Testverfahren wurde unter Zugrundelegung der unterschiedlichen Methodik belassen.

2.4 Auswahl der Probanden

Sämtliche Untersuchungen wurden an stationären Kindern im Alter zwischen 2 und 14 Jahren durchgeführt. Sie wurden so ausgewählt, daß man davon ausgehen konnte, daß die Probanden zum Zeitpunkt der Untersuchung als "gesund" bezeichnet werden konnten. Dem Terminus "klinisch gesund" haben wir dabei folgende Kriterien zugrunde gelegt:

Zum Zeitpunkt der Untersuchung

- war die Behandlung bereits abgeschlossen,
- bestand kein Fieber,
- lagen die Laborwerte im Normbereich (BKS, Leukozyten, Elektrophorese),
- stand die Entlassung kurz bevor.

Allerdings sind Nachwirkungen auf die uns interessierenden Veränderlichen nicht ausgeschlossen.

3. STATISTIK

Mittelwert ($\bar{x}$), Standardabweichung (s) und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) wurden mit einem Taschenrechner ermittelt.

Die statistische Auswertung des Datenmaterials kann nur begrenzt als statistische Analyse angesehen werden; die Ergebnisse haben überwiegend orientierenden Charakter. Für die vergleichenden Messungen wurde eine lineare Regression durchgeführt.

4. METHODIK

4.1 Makrotest (modifiziert nach BRANDT (10))

Das von BRANDT angegebene Verfahren ist materialaufwendig und wurde von uns deshalb als "Makrotest" bezeichnet.

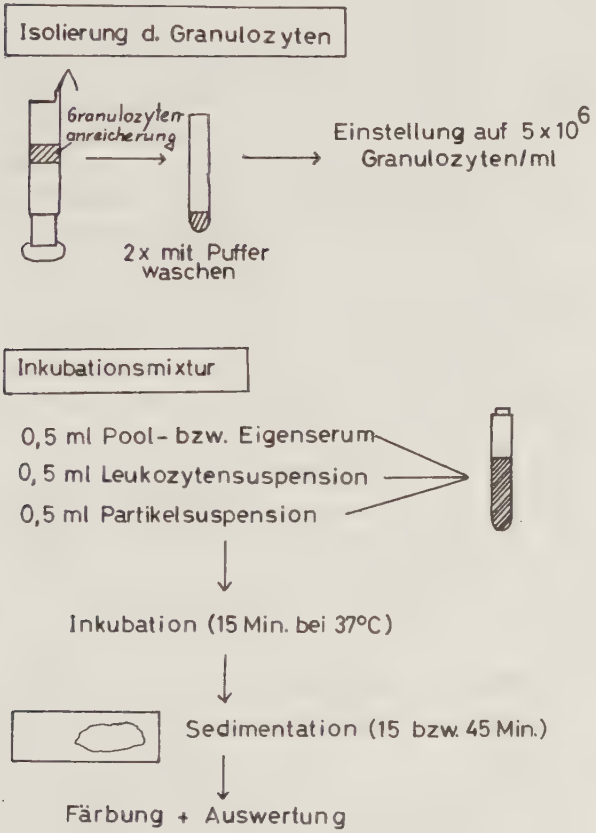


Abb. 2: Schema des Test-Verfahrens

4.1.1 Herstellung der Lösungen

4.1.1.1 Herstellung der Dextranlösung

Dextran T 500 1,5 %
7,5 g in 500 ml NaCl lösen, in sterile Flaschen abfüllen, autoklavieren lassen. Im Kühlschrank aufbewahren.

4.1.1.2 Herstellung der Partikelsuspension

Ca. 5 g Bäckerhefe (Saccharomyces cerevisiae) in 30 ml 0,9 % NaCl lösen und im Wasserbad bei 100°C 30 Min. erhitzen. Nach Abkühlung diese Suspension dreimal durch Gaze filtrieren und gründlich schütteln, um die Aggregatbildung der Partikel möglichst zu vermeiden. Anschließend wird die Suspension mit 0,9 % NaCl verdünnt und mit Hilfe der Neubauer Zählkammer auf 4,0 - 4,2 x 10^7 Hefezellen/ml eingestellt. Die Partikelsuspension zu je 3 ml in sterile Röhrchen abfüllen und bei - 20° C einfrieren.

Einstellung der Hefepartikel im Mikroskop:
25 µl Partikelsuspension mit 0,475 ml NaCl mischen. In der Neubauer Zählkammer 4 Quadrate auszählen (ca. 200 Zellen/Quadrat). Summe der 4 Quadrate x 50 x 1000 = Partikel/ml.
Sollwert: 4,0 - 4,2 x 10^7 Partikel/ml

4.1.1.3 Herstellung des Poolserums

Das Poolserum dient zur Kontrolle des Testverfahrens.
5 gesunden Spendern 15 - 20 ml Venenblut abnehmen und zentrifugieren, bis das Serum klar ist, Die Seren in sterilem Glasbehälter mischen, in aliquoten Teilen in sterile Plastikröhrchen füllen und

bei -20° C einfrieren.
Zum Testansatz Serum mit 0,9% NaCl im Verhältnis 1:5 verdünnen.

4.1.1.4 Herstellung des Eigenserums

Dem Probanden 3-4 ml Venenblut in ein steriles Plastikröhrchen entnehmen und zentrifugieren, bis das Serum klar ist (ca. 4 Min.).
Zum Testansatz Serum mit 0,9% NaCl im Verhältnis 1:5 verdünnen.

4.1.1.5 Herstellung der Leukozytensuspension

(Isolierung der Granulozyten)
Ca. 10 ml Venenblut in eine heparinisierte Spritze abnehmen und im Verhältnis 2:1 mit 1,5% Dextran T 500 (MG 500 000) versetzen. Durch den molekularen Siebeffekt hat sich nach 30 Min. Sedimentation in der aufrechten Kunststoffspritze ein leukozytenreicher Überstand gebildet. Diesen durch die gebogene Blutentnahmekanüle vorsichtig in ein steriles Plastikröhrchen abpressen und 7 Min. bei 500 g (= 2.500 UpM) zentrifugieren. Den Überstand wegkippen, die sedimentierte Leukozytenschicht zweimal mit Puffer (RPMI 1640 IX with L-Glutamine) waschen. Die Suspension mit Hilfe der Neubauer Zählkammer auf 5 x 10^6 Segmentkernige/ml einstellen.

Einstellung der Leukozytensuspension:
25 µl Zellsuspension in 0,475 ml Essigsäure mischen, in Neubauer Zählkammer 4 Quadrate auszählen (ca. 25 Zellen/Quadrat). Summe der 4 Quadrate x 50 x 1000 = = Partikel/ml.
Sollwert: 5 x 10^6 Granulozyten/ml

4.1.2 Durchführung des Makrotests

4.1.2.1 Blutentnahme

8 - 10 ml Venenblut zur Herstellung der Leukozytensuspension (s. 4.1.1.5) in eine heparinisierte Spritze entnehmen.

Ca. 4 ml Nativblut in steriles Röhrchen zur Gewinnung des Eigenserums (s. 4.1.1.4) entnehmen.

4.1.2.2 Testansatz

0,5 ml Leukozytensuspension
+ 0,5 ml Partikelsuspension
+ 0,5 ml mit 0,9% NaCl verdünntes Pool- bzw. Eigenserum

in ein Reagenzglas pipettieren (Eppendorf-Pipette) und 15 Min. im rotierenden System bei 37°C inkubieren.
Das Verhältnis Hefepartikel zu Granulozyt ergibt nach BRANDT (10) mit 6-10:1 ein optimales Mischungsverhältnis.

4.1.2.3 Berechnung des Phagozytoseindex

Je 0,5 ml des Inkubationsgemisches auf einen Objektträger pipettieren und 15 bzw. 45 Min. bei Zimmertemperatur in feuchter Kammer inkubieren. Anschließend werden die Präparate vorsichtig mit NaCl gespült, föngetrocknet und nach PAPPENHEIM gefärbt (s. Abb. 3).

Die Auswertung erfolgt mikroskopisch bei einer 1000-fachen Vergrößerung: bei 100 Granulozyten wird jeweils die Anzahl der pro Granulozyt phagozytierten Partikel gezählt. Nach dem angegebenen

Beispiel errechnet sich der Phagozytose-Index: Anzahl der phagozytierten Hefepartikel pro Granulozyt als Mittelwert aus 100 Granulozyten.

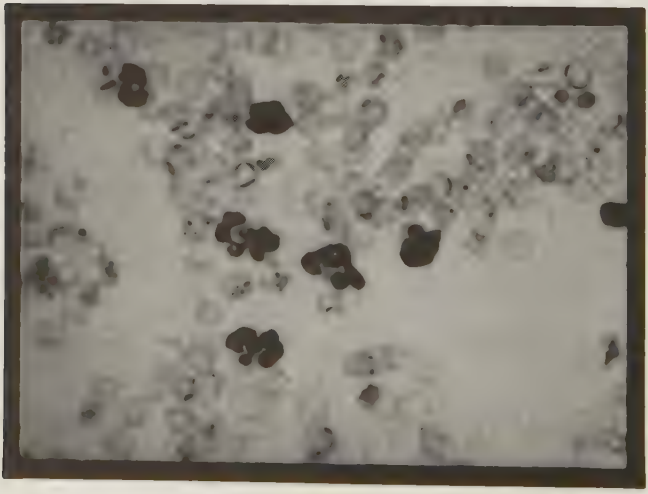
Beispiel: Die Zahl der Partikel pro Zelle wird mit der Zahl der gezählten Granulozyten multipliziert.

Partikel		Zelle		
0	x	3	=	0
1	x	12	=	12
2	x	20	=	40
3	x	26	=	78
4	x	22	=	88
5	x	7	=	35
6	x	8	=	48
7	x	1	=	7
8	x	1	=	8
		100		3,16 = Phagozytose-Index

Abb. 3: Phagozytose von Hefepartikel durch humane Granulozyten im Makro- und Mikrotest

a) Makrotest

b) Mikrotest



4.2 Mikrotest (modifiziert nach WEHINGER (81))

Das von WEHINGER angegebene Verfahren ist material- und zeitsparend und wurde von uns deshalb als "Mikrotest" bezeichnet.

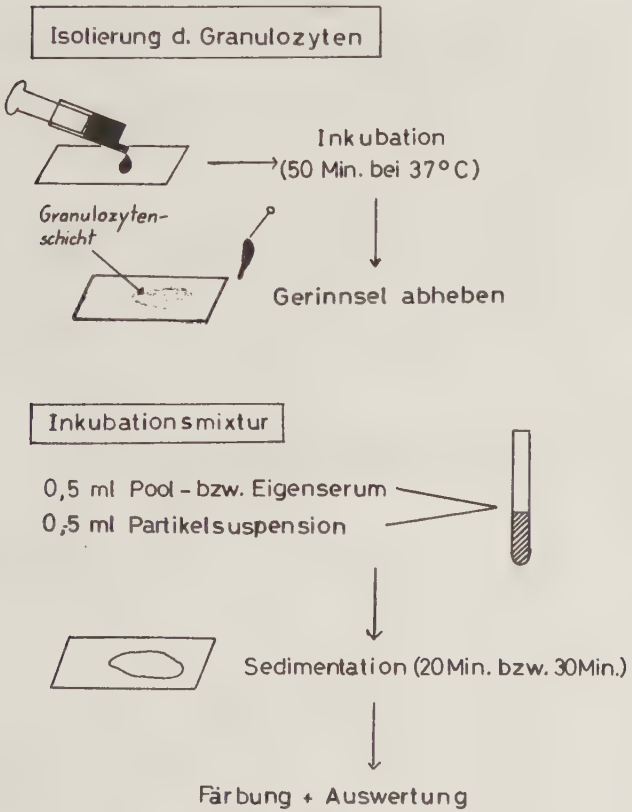


Abb. 4: Schema des Test-Verfahrens

4.2.1 Herstellung der Lösungen

4.2.1.1 Herstellung der Partikelsuspension

Die Suspension der Hefepartikel wird wie in 4.1.1.2 beschrieben hergestellt.

4.2.1.2 Herstellung des Poolserums

Das Kontrollserum wird wie in 4.1.1.3 beschrieben hergestellt.
Zum Testansatz Serum mit 0,9% NaCl im Verhältnis 1:6 verdünnen.

4.2.1.3 Herstellung des Eigenserums

Das Eigenserum wird wie in 4.1.1.4 beschrieben hergestellt.
Zum Testansatz Serum mit 0,9% NaCl im Verhältnis 1:6 verdünnen.

4.2.2 Durchführung des Mikrotests

4.2.2.1 Blutentnahme

2 - 3 ml Venenblut in eine nicht heparinisierte Spritze entnehmen.

Anmerkung: Rasche Verarbeitung erforderlich!!

4.2.2.2 Isolierung der Granulozyten

100/ul Nativblut auf entfetteten Objektträger bringen und 50 Min. bei 37^{0} C in feuchter Kammer inkubieren. Das Gerinnsel vorsichtig mit einer Nadel abheben; den Objektträger sehr vorsichtig mit 0,9% NaCl spülen, um Erythrozyten

weitgehend zu entfernen. Infolge der Haftfähigkeit der Leukozyten (81,2,3,23,61) hat sich auf dem Objektträger eine dünne Granulozytenschicht gebildet.

4.2.2.3 Testansatz

0,5 ml Partikelsuspension
+ 0,5 ml 0,9% NaCl verdünntes Pool- bzw. Eigenserum
in einem Reagenzglas mischen. Das Verhältnis Hefepartikel zu Granulozyt beträgt 7-14:1.

4.2.2.4 Berechnung des Phagozytoseindex

Je 0,5 ml der Inkubationsmixtur auf die noch feuchte Granulozytenschicht pipettieren und 20 Min. bzw. 30 Min. bei Zimmertemperatur in feuchter Kammer inkubieren.

Die Auswertung erfolgt nach Spülen, Föntrocknen und Färben mikroskopisch wie bei 4.1.2.3 beschrieben.

5. MATERIAL

5.1 Makrotest

10 - 14 ml Nativblut

Heparin (Thrombophob)

Dextran T 500 (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Schweden)

Puffer (RPMI 1640 (IX), with 25 mM Hepes/with L-Glutamine, Gibco Europe, Glasgow, Schottland)

Kontrollserum (= Poolserum)

Eigenserum

0,9 % NaCl

Hefepartikel 4.0 - 4.2 x 10^7/ml

Objektträger

Pipetten

PAPPENHEIM-Färbung

5.2 Mikrotest

3 - 4 ml Nativblut

Kontrollserum (= Poolserum)

Eigenserum

0,9 % NaCl

Hefepartikel 4.0 - 4.2 x 10^7/ml

Objektträger

Pipetten

PAPPENHEIM-Färbung

6. VERSUCHE UND ERGEBNISSE

6.1 Untersuchungen zum Makrotest

6.1.1 Einfluß eines rotierenden Systems auf die Phagozytose (Tab. 2)

In der nach BRANDT (10) modifizierten Methode wird das Gemisch in einem langsam rotierenden System 15 Min. bebrütet, auf Objektträger gebracht und für weitere 15 bzw. 45 Min. in Ruhe inkubiert. Durch die Rotation sollen die Kollisionsmöglichkeiten zwischen Partikel und Phagozyten gesteigert werden (FENN (21,22)).

Bei 11 Probanden wurde der Phagozytoseindex mit und ohne Rotor in jeweils 15-minütigen Abständen bei einer Inkubationsdauer von 1 Stunde gemessen. Bei 3 Probanden waren die 45-Minuten-Werte nicht auswertbar. In den übrigen Fällen sind die Phagozytoseindices ohne Rotor geringfügig erhöht, allerdings ist der Unterschied nicht signifikant. Der Einfluß ist ferner beim Poolserum geringer als beim Eigenserum.

Nach den vorliegenden Ergebnissen scheint ein schonendes 15minütiges Rotieren den Phagozytosevorgang nicht wesentlich zu beeinflussen.

Tab. 2: Einfluß des Rotors auf die Phagozytose (Makrotest)

MAKRO

	Mit Rotor (15 Min.)						ohne Rotor					
Zeit	30'		45'		60'		30'		45'		60'	
Name	Pool	ES	Pool	ES	Pool	ES	Pool	ES	Pool	ES	Pool	ES
E.M.	3.34	3.08	4.30	4.60	4.50	3.84	4.25	4.51	3.85	4.58	4.63	5.10
P.K.	4.63	4.66	4.85	4.19	5.70	3.85	4.91	5.57	5.70	5.42	6.16	5.28
P.Sch.	4.30	4.20	4.03	3.91	4.56	4.40	4.04	4.54	4.45	3.52	5.29	4.09
W.M.	4.16	4.28	4.10	4.43	4.44	4.61	5.45	5.89	5.95	4.25	5.70	5.99
M.M.	4.34	4.08	5.43	4.57	4.87	5.05	4.69	3.83	4.10	5.05	5.43	5.51
K-H.L.	5.15	5.51	-	-	5.66	5.61	5.36	5.57	-	-	5.55	6.02
M.R.	5.75	5.35	-	-	5.86	6.06	5.08	4.86	-	-	5.72	5.84
S.	5.59	5.71	-	-	6.09	6.32	5.23	5.50	-	-	6.58	6.34
A.J.	4.35	4.35	5.21	5.17	5.55	5.35	5.38	4.91	5.57	5.05	5.69	5.42
M.N.	4.96	4.98	5.53	5.17	5.87	5.79	4.88	5.07	5.47	5.56	6.15	6.35
Th.B.	4.82	4.65	4.77	5.15	5.42	5.54	4.35	4.56	4.93	5.31	5.36	5.31
$\bar{x}$	4.67	4.62	4.78	4.65	5.32	5.13	4.87	4.98	5.00	4.84	5.66	5.57
SEM	0.21	0.23	0.21	0.17	0.18	0.26	0.14	0.18	0.28	0.24	0.16	0.20
s	0.69	0.75	0.59	0.48	0.61	0.85	0.48	0.61	0.79	0.69	0.52	0.65

6.1.2 Einfluß einer genau definierten Granulozyteneinstellung auf den Phagozytoseindex (Tab. 3)

Im Makrotest wird eine definierte Leukozytensuspension von 5.0 x 10^6 Segmentkernige/ml verwendet. Inwieweit eine konstante Granulozytenzahl von Bedeutung ist, haben wir bei 5 Probanden nachgeprüft. Die Granulozyten wurden mit Hilfe der Neubauer Zählkammer auf jeweils 2.5 x 10^6, 5.0 x 10^6 und 10.0 x 10^6 Segmentkernige/ml eingestellt.

Nach den vorliegenden Ergebnissen zeigt sich beim Poolserum (PS) nach 15 und 45 Minuten sowie beim Eigenserum (ES) nach 15 Minuten jeweils eine signifikante Erniedrigung des Phagozytoseindex (PI) mit zunehmender Granulozytenzahl.
Beim Eigenserum 45 Minuten ist der PI bei einer Versuchsperson zwischen 2.5 und 5.0 x 10^6 Granulozyten nahezu unverändert, bei einer weiteren deutlich erhöht.

Die Regressionsbeziehung ist in der nachstehenden Grafik dargestellt (Abb. 5).

Tab. 3: Einfluß unterschiedlicher Granulozytenkonzentrationen auf das Phagozytoseverhalten im Makrotest

	Poolserum (PS)						Eigenserum (ES)					
	2.5 x 10^6		5.0 x 10^6		10.0 x 10^6		2.5 x 10^6		5.0 x 10^6		10.0 x 10^6	
Name	15'	45'	15'	45'	15'	45'	15'	45'	15'	45'	15'	45'
A.K.	5.54	6.15	4.38	5.15	3.54	4.07	5.45	5.76	5.08	5.87	3.98	4.10
D.P.	5.66	5.68	4.12	4.98	2.57	2.77	4.38	5.21	4.25	6.06	2.61	3.66
G.H.	4.85	4.76	3.84	4.38	3.48	2.97	5.53	6.18	4.19	4.68	3.43	3.05
P.B.	5.72	6.45	3.95	4.67	3.00	3.35	6.01	6.44	4.57	5.09	3.12	3.13
E.M.	5.55	5.60	3.34	4.50	3.13	3.35	5.59	5.87	3.08	3.84	2.94	3.28
$\bar{x}$	5.46	5.42	3.93	3.14	3.14	3.30	5.39	5.89	4.23	5.11	3.21	3.49
SEM	0.16	0.29	0.17	0.14	0.18	0.22	0.27	0.21	0.33	0.40	0.23	0.22
s	0.35	0.64	0.38	0.32	0.39	0.50	0.61	0.47	0.73	0.91	0.52	0.49

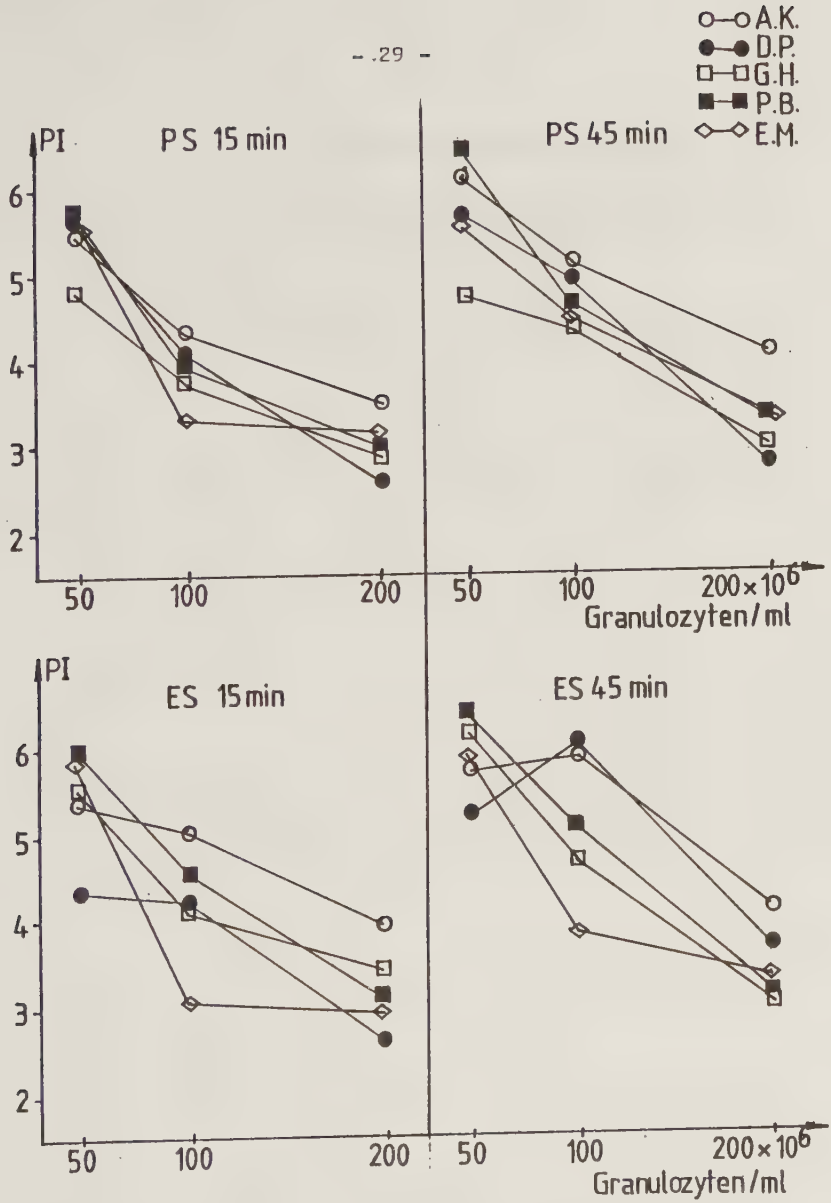


Abb. 5: Phagozytose von Hefepartikeln bei verschiedenen Granulozytenkonzentrationen im Makrotest

6.2 Untersuchungen zum Mikrotest

6.2.1 Einfluß tageszeitlich bedingter Schwankungen auf die Phagozytose (Tab. 4)

Bei 12 Probanden wurde der Phagozytoseindex (PI) zu zwei verschiedenen Tageszeiten geprüft. Die Blutabnahme erfolgte jeweils um 8.30 h und 11.00 h.

Mit Ausnahme von ES 20 Min. liegen die Werte von 11.00 h geringfügig unter denen von 8.30 h. Die Ergebnisse sind sowohl beim Pool- als auch beim Eigenserum nicht signifikant. Der durchschnittliche Unterschied (d) zwischen 8.30 h und 11.00 h beträgt 0.386 bei Pool 20 Min., 0.020 bei Pool 30 Min., 0.084 bei ES 20 Min. und 0.016 bei ES 30 Minuten.

Eine weitere Versuchsperson stellte sich freiwillig zu einer sechsmaligen Blutabnahme zur Verfügung. (8.00 h, 9.00 h, 12.00 h, 13.00 h, 16.00 h, 17.30 h)

Tab. 5 und Abb. 5 lassen einen leichten Abfall des PI im Verlauf des Tages, insbesondere gegen Abend erkennen.

Tab. 4: Mikrotest zu zwei verschiedenen Tageszeiten
Test I: Blutabnahme 8.30 h, Test II: Blutabnahme 11.00 h

	TEST I				TEST II					
Name	Pool 20'	Pool 30'	ES 20'	ES 30'	Pool 20'	Pool 30'	ES 20'	ES 30'	Gesamt-Leukos	Seg.%
C.Sch.	4.39	4.16	4.61	4.28	4.25	3.77	4.21	4.23	5.100	60
M.B.	3.67	3.63	4.08	3.83	3.85	3.46	3.86	3.84	7.000	62
H.H.	5.53	4.64	5.59	5.18	4.09	4.77	5.34	5.07	6.700	53
M.R.	3.06	2.57	3.35	3.61	3.98	5.06	3.38	3.61	16.000	Ø
A.K.	4.19	4.38	2.04	2.58	3.73	4.77	1.65	1.67	5.400	33
R.H.	4.95	3.08	3.39	2.46	4.11	4.16	4.08	3.10	Ø	Ø
M.K.	3.77	3.96	3.61	4.04	3.04	3.45	2.58	3.22	7.800	53
A.B.	3.88	4.72	4.19	4.09	3.44	4.11	4.15	3.99	6.300	49
D.B.	3.51	4.40	3.47	4.03	3.43	3.84	3.51	3.18	6.500	47
D.J.	4.50	4.81	4.11	5.18	4.55	3.50	4.47	4.05	7.400	35
N.Z.	3.76	4.54	3.84	4.53	4.14	4.46	3.95	4.78	7.500	54
R.B.	7.03	7.34	5.06	4.56	5.00	6.63	7.17	7.43	6.500	44
$\bar{x}$	4.354	4.353	3.945	4.030	3.968	4.333	4.029	4.014		
$d(\bar{x}$ Test I - $\bar{x}$ Test II)					0.386	0.020	0.084	0.016		

6.2.2 Einfluß der Nahrungsmittelaufnahme auf die Phagozytose (Tab. 5)

Bei einer Versuchsperson wurde der PI vor und nach Nahrungsaufnahme zu sechs verschiedenen Tageszeiten bestimmt. Die Ergebnisse sind aus Tab. 5 und Abb. 5 ersichtlich. 3 Präparate waren infolge Cytolyse nicht auswertbar. PS 20 Min. läßt keine Abhängigkeit von der Zeit erkennen; bei PS 30, ES 20 und ES 30 ist allgemein nach Nahrungsaufnahme ein leichter Abfall des PI zu sehen.

Abgesehen von Poolserum 20 Min. ist allgemein nach Nahrungsaufnahme ein leichter Abfall des PI erkennbar.

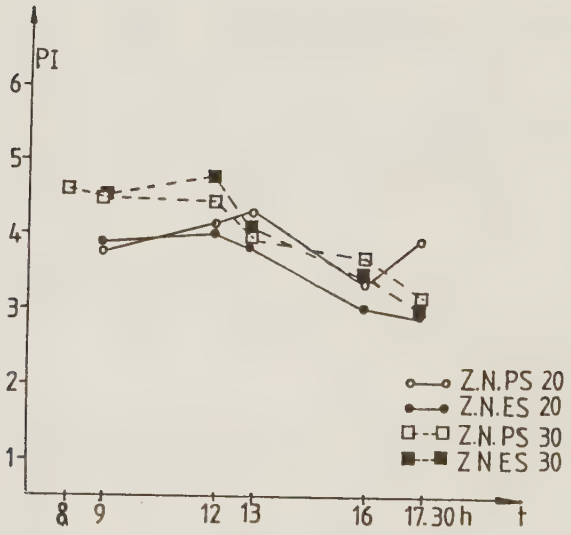


Abb. 5: Phagozytose vor und nach Nahrungsaufnahme im Tagesverlauf (Mikrotest)

Tab. 5: Mikrotest in Abhängigkeit von der Nahrungsmittelaufnahme im Tagesverlauf
Testperson: N.Z., geb. 13.12.1965

Zeit	Pool 20'	Pool 30'	ES 20'	ES 30'	Gesamt-Leukos	Segmentk.
8.00 (vor d. Essen)	Ø	4.60	Ø	Ø	7.500	60
9.00 (nach d. Essen)	3.76	4.54	3.84	4.53	7.500	54
12.00 (vor d. Essen)	4.14	4.46	3.95	4.78	8.800	51
13.00 (nach d. Essen)	4.27	3.96	3.90	4.03	8.200	41
16.00 (vor d. Essen)	3.32	3.67	3.00	3.45	7.800	47
17.30 (nach d. Essen)	3.88	3.15	2.98	3.02	9.600	55
$\bar{x}$	3.874	4.06	3.53	3.96		
s	0.37	0.58	0.50	0.73		
r	0.26	0.90	0.98	0.90		

6.2.3 Einfluß der Inkubationszeit auf die Phagozytose im Mikrotest (Tabellen 6a und 6b)

WEHINGER (81) beschrieb in seinen Untersuchungen ein Maximum der Phagozytose nach 30 Minuten. Wir haben den Einfluß der Inkubationszeit auf die Phagozytose bei zwei Versuchspersonen in Abständen von jeweils 10 Minuten geprüft, bei weiteren 14 Versuchspersonen nach 20, 30 und 45 Minuten.

Die Ergebnisse der untersuchten Probanden Z.N. und M.E. (Tab. 6a und Abb. 6a) zeigen keinen eindeutigen Maximalwert. Ein linearer Anstieg der Phagozytoseindices mit zunehmender Inkubationszeit ist nicht festzustellen. Bei Proband Z.N. ist die Phagozytose nach 20 Minuten abgeschlossen; auch bei M.E. findet sich ein erster Kurvengipfel (s. Abb. 6b) innerhalb dieses Zeitraumes, ein zweites Maximum zeigt sich nach 50 Min. (ES) bzw. 60 Min. (PS).

Auch Tab. 6b liefert keinen eindeutigen Maximalwert. Im Mittel liegt er beim Poolserum bei 30 Minuten (3.58 ± 0.34), beim Eigenserum bei 45 Min. (3.56 ± 0.40).

Tab. 6a: Einfluß der Inkubationszeit auf das Phagozytoseverhalten im Mikrotest

Probanden: Z.N., geb. 13.12.65; Ges.Leukozyten: 7.400
M.E., geb. 17.12.68; Ges.Leukozyten: 7.000

	Pool			ES		
Ink.zeit	Z.N.	M.E.	$\bar{x}$	Z.N.	M.E.	$\bar{x}$
10 Min.	2.17	1.86	2.02	2.81	1.27	2.04
20 Min.	3.74	4.70	4.22	2.93	3.72	3.33
30 Min.	3.49	3.93	3.71	2.51	4.23	3.37
40 Min.	1.83	5.13	3.48	1.99	5.04	3.52
50 Min.	2.17	6.28	4.22	2.32	5.51	3.91
60 Min.	2.27	6.83	4.55	2.10	4.53	3.31
s			0.83			1.23
r_{Zeit}			0.73			0.27

Tab. 6b: PI-Werte im Mikrotest mit Pool- und Eigenserum zu drei verschiedenen Inkubationszeiten

	Pool			ES		
Name	20	30	45	20	30	45
M.G.	2.65	2.80	3.82	2.68	2.48	2.93
P.K.	1.96	2.60	2.50	1.69	1.77	2.50
T.K.	3.29	4.35	2.58	2.61	3.44	3.55
C.S.	2.20	3.13	3.00	Ø	Ø	Ø
W.M.	3.09	4.83	4.24	3.86	3.45	4.61
A.H.	1.82	2.58	2.85	0.92	1.39	Ø
H.B.	2.84	4.01	4.34	2.75	2.79	3.80
A.S.	1.31	1.70	1.48	1.11	1.55	1.33
T.K.	2.77	3.88	Ø	2.31	2.44	3.65
J.M.	3.71	4.20	3.64	3.70	4.89	4.67
S.G.	3.75	4.14	3.68	3.84	2.53	3.23
A.H.	1.81	1.45	1.56	1.50	1.55	1.48
P.K.	3.47	4.40	4.20	3.47	4.69	5.11
St.	5.73	6.06	5.78	5.78	6.46	5.86
$\bar{x}$	2.89	3.58	3.36	2.79	3.03	3.56
SEM	0.30	0.34	0.33	0.38	0.42	0.40
s	1.08	1.22	1.15	1.30	1.47	1.32

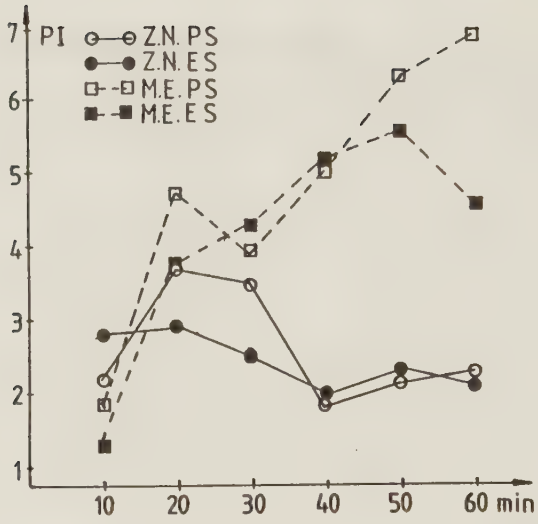


Abb. 6a: Phagozytoseindices (PI) im Mikrotest mit Pool- und Eigenserum bei unterschiedlichen Inkubationszeiten (2 Probanden)

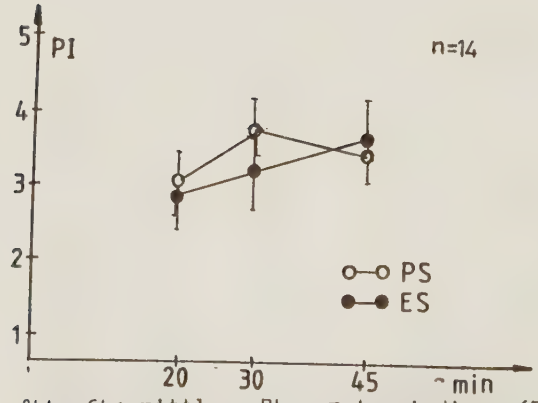


Abb. 6b: mittlere Phagozytoseindices (PI) im Mikrotest mit Pool- und Eigenserum zu 3 verschiedenen Inkubationszeiten (14 Probanden)

6.2.4 Einfluß einer definierten Partikelkonzentration auf die Phagozytose im Mikrotest (Tab. 7)

In Analogie zum Makrotest (s. 6.1.2) wurde die Bedeutung eines konstanten Verhältnisses Partikel/Granulozyt im Mikrotest an 3 Probanden untersucht. Die Hefepartikel wurden mit 0,9% NaCl im Verhältnis 1:1 (unverdünnt), 1:5 (Standardverdünnung), 1:10 und 1:15 verdünnt. Die Ergebnisse sind in Tab. 7 wiedergegeben.

Die Untersuchungen zeigen beim Poolserum eine signifikante Erniedrigung der PI-Werte mit zunehmender Verdünnung. Beim Eigenserum wird bei Proband J.U. beim Übergang von 1:10 auf 1:15 ein leichter Anstieg der PI-Werte notiert. Insgesamt erniedrigen sich jedoch auch beim Eigenserum die PI-Werte mit absteigender Partikelkonzentration.

Die Abhängigkeit Phagozytoseindex/Partikelkonzentration ist in Abb. 7 graphisch dargestellt.

Tab. 7: Einfluß unterschiedlicher Partikelkonzentrationen auf das Phagozytoseverhalten im Mikrotest

	Poolserum						Eigenserum					
Name	T.F.		J.U.		M.S.		T.F.		J.U.		M.S.	
Verdünnung	20	30	20	30	20	30	20	30	20	30	20	30
1: 1	5.89	6.70	4.26	4.75	4.30	4.29	4.50	5.35	5.13	7.28	3.83	3.87
1: 5	3.35	3.93	3.42	5.39	3.27	3.29	1.88	3.55	4.52	6.19	2.12	2.51
1:10	1.29	1.33	2.43	2.92	1.37	2.98	0.72	1.28	1.20	2.55	1.88	0.52
1:15	0.64	0.75	1.18	3.30	0.64	0.98	0.39	0.40	2.10	3.43	1.12	0.42

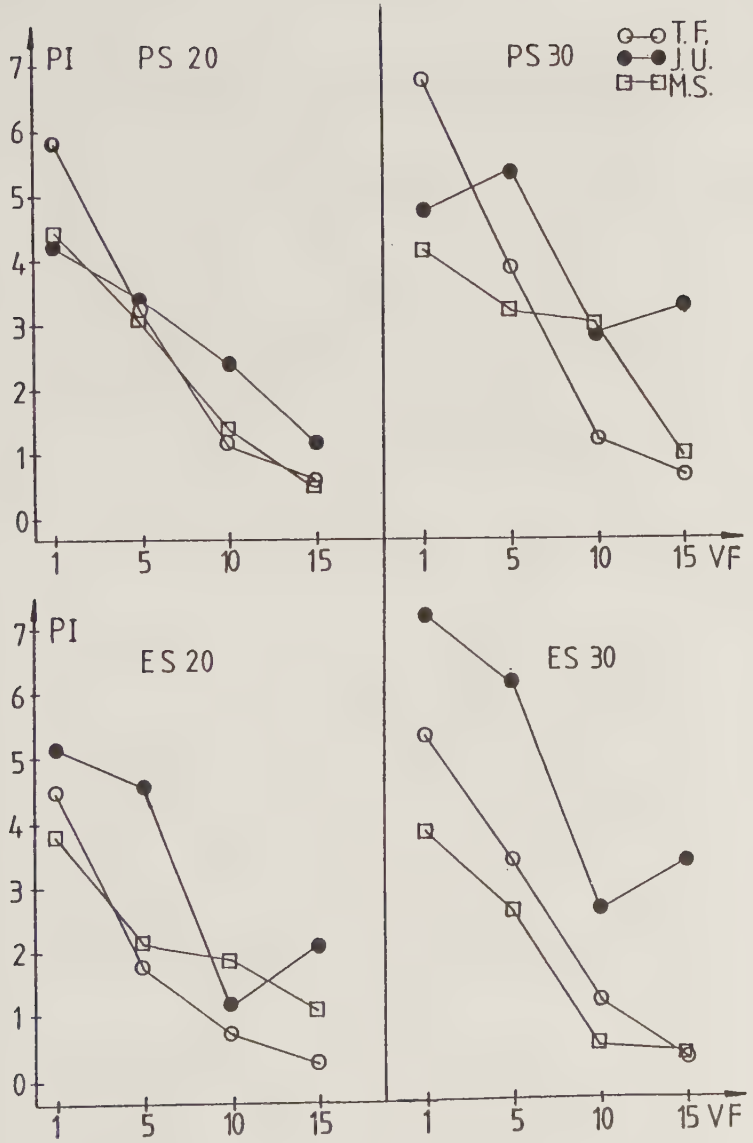


Abb. 7: Einfluß unterschiedlicher Partikelkonzentrationen auf die Phagozytose im Mikrotest
(VF = Verdünnungsfaktor; Verdünnung der Hefepartikel mit 0,9% NaCl im Verhältnis 1:1, 1:5, 1:10 u. 1:15)

6.3 Vergleichende Messungen mit der Makro- und Mikromethode

6.3.1 Einfluß der Serumverdünnung auf die Phagozytose im Makro- und Mikrotest (Tab. 8a u. 8b)

In beiden Testverfahren findet die Phagozytose mit 0.9% NaCl verdünntem Pool- bzw. Eigenserum statt. Das Serum dient als Komplementquelle. Beim Makrotest wird im Verhältnis 1:5, beim Mikrotest im Verhältnis 1:6 verdünnt. Inwieweit unterschiedliche Serumkonzentrationen den Phagozytoseindex beeinflussen, wurde an drei Probanden in einer ansteigenden Verdünnungsreihe untersucht. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 8a und 8b wiedergegeben.

Nach den vorliegenden Ergebnissen scheint der Verdünnungsfaktor nur in einem sehr hohen Bereich eine Rolle zu spielen.
Beim Makrotest bewegen sich die PI-Werte bei einer Verdünnung zwischen 1:5 und 1:15 im Normbereich; eine signifikante Erniedrigung der Indices tritt bei der Verdünnung 1:50 auf (PI 3.5). Unter Zugabe von reinem NaCl wird im Makrotest nahezu keine Phagozytose beobachtet (PI $\prec$ 1). Bei Makro Eigenserum, 15 Min., ist mit ansteigender Verdünnung eine größere Streuung der PI-Werte zu verzeichnen.

Auch beim Mikrotest scheint der optimale Verdünnungsbereich zwischen 1:5 und 1:15 zu liegen. Das Absinken der PI-Werte bei höherer Verdünnung ist im Vergleich zum Makrotest nicht so deutlich;

auch unter Zugabe von reinem NaCl werden noch PI-Werte zwischen 1.63 und 2.97 beim Poolserum (PS), zwischen 1.28 und 2.98 beim Eigenserum (ES) registriert. Die Streuung ist beim Mikrotest in allen Verdünnungen größer als beim Makrotest.

Die Abhängigkeit PI/Serumkonzentration ist in den Abbildungen 8a und 8b graphisch dargestellt. Die horizontalen Linien geben die PI-Werte unter der Standardserumkonzentration wieder.

Tab. 8 a: Phagozytoseverhalten mit verdünntem Poolserum im Makro- und Mikrotest

	Makrotest						Mikrotest					
Name	S.S.		G.H.		T.B.		S.S.		G.H.		T.B.	
Verdünnung	15	45	15	45	15	45	20	30	20	30	20	30
1: 1	4.55	5.34	3.94	4.54	3.04	3.14	4.68	4.64	3.49	3.04	4.20	5.93
1: 4	-	-	-	-	-	-	4.56	4.36	3.28	3.08	4.35	5.42
1: 5	4.49	5.28	3.84	4.38	4.82	5.42	-	4.82	3.32	3.56	4.43	4.27
1: 6	3.78	4.49	4.76	5.22	3.52	4.34	3.55	4.85	2.98	3.77	4.39	5.45
1: 8	5.04	6.17	4.22	4.88	4.88	4.75	3.94	5.24	3.76	4.41	4.81	4.72
1:10	5.21	4.98	4.15	5.30	4.90	5.56	4.98	5.15	3.36	3.86	3.71	5.91
1:15	4.76	3.66	4.51	5.70	4.62	4.60	3.83	4.68	3.35	2.88	3.88	3.21
1:20	3.67	3.12	5.02	4.56	4.48	5.77	3.34	4.02	2.37	3.38	3.99	5.09
1:50	1.12	1.34	2.88	3.12	0.78	1.04	2.41	3.37	1.98	1.93	2.50	4.68
0 (NaCl)	0.28	0.68	0.72	0.10	0.50	0.48	2.34	2.25	1.63	2.57	3.23	2.97

Tab. 8b: Phagozytoseverhalten mit verdünntem Eigenserum im Makro- und Mikrotest
1:1 = ausschließlich Serumzugabe, 0 = ausschließlich NaCl-Zugabe

	Makrotest						Mikrotest					
Name	C.B.		S.B.		T.B.		C.B.		S.B.		T.B.	
Ink.zeit	15	45	15	45	15	45	20	30	20	30	20	30
Verd. 1:1	3.84	3.21	4.33	4.78	3.04	3.14	2.84	3.17	5.86	6.11	5.35	5.16
1:5	3.78	4.99	4.86	5.98	4.82	5.42	3.21	4.63	4.39	4.89	4.82	5.08
1:6	2.33	3.78	4.88	4.76	4.02	4.34	2.90	3.12	5.42	5.11	4.43	4.76
1:8	3.34	4.08	3.98	4.15	4.33	4.78	2.77	3.12	4.91	4.40	4.10	4.33
1:10	3.20	Ø	4.12	4.37	4.19	4.56	3.25	4.82	2.55	2.49	2.85	4.78
1:15	3.88	3.56	4.21	4.33	4.62	4.60	3.34	3.99	3.40	3.21	3.18	3.43
1:20	2.22	3.34	3.08	4.30	4.48	5.77	3.23	3.50	2.98	3.35	3.41	3.68
1:50	0.19	0.28	2.12	2.38	0.80	1.04	2.46	3.08	2.20	2.33	3.25	2.90
0(NaCl)	<0.10	<0.10	0.24	0.32	0.50	0.68	2.98	2.24	1.28	1.43	2.67	2.69

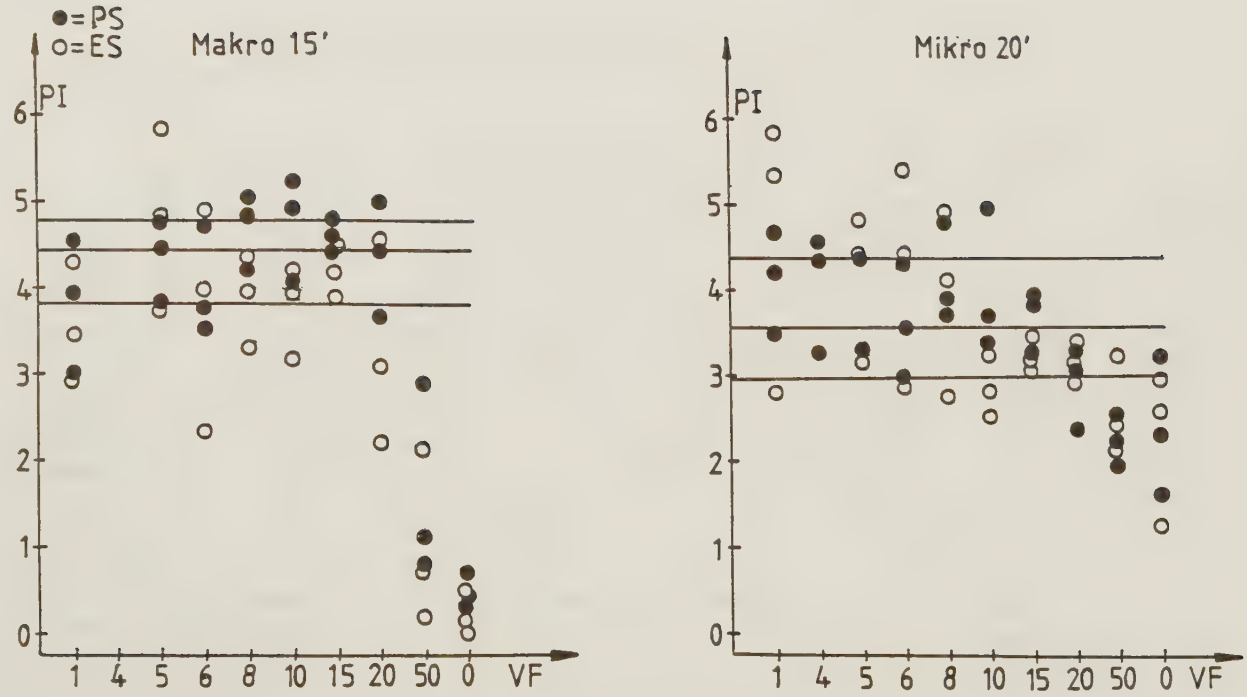


Abb. 8a: Vergleich der Phagozytoseindices bei ansteigender Serumverdünnung im Makro- und Mikrotest. Auswertung im Makrotest nach 15 Min., im Mikrotest nach 20 Min. (VF = Verdünnungsfaktor; Verdünnung der Pool (●)- und Eigenserumkonzentration (○) mit 0,9% NaCl von 1:1 (unverdünnt) auf 1:50; 0 = ohne Serum).

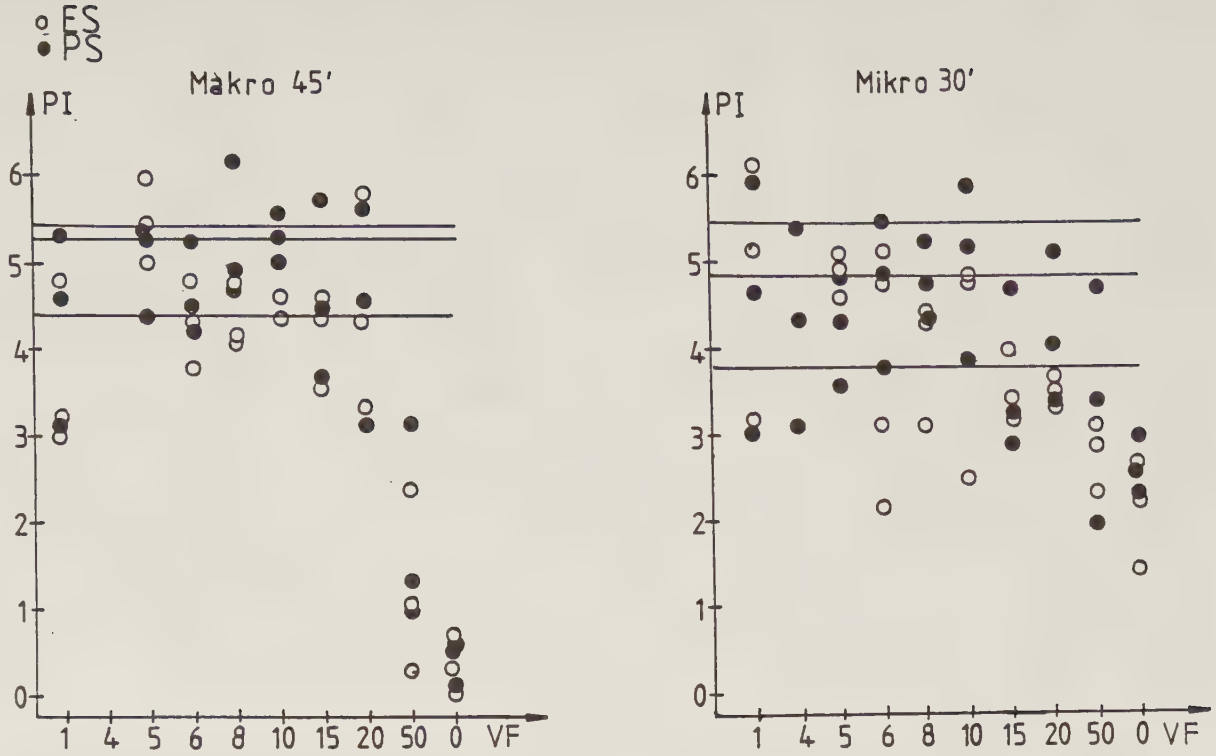


Abb. 8b: Vergleich der Phagozytoseindices bei ansteigender Serumverdünnung im Makro- und Mikrotest. Auswertung im Makrotest nach 45 Min., im Mikrotest nach 30 Min. (VF = Verdünnungsfaktor; Verdünnung der Pool (●)- und Eigenserumkonzentration (o) mit 0,9% NaCl von 1:1 (unverdünnt) auf 1:50; 0 = ohne Serum).

6.3.2 Makrotest - Mikrotest

Prüfung auf Korrelation und vergleichende Beurteilung der einzelnen begleitenden Paramenter

6.3.2.1 Vergleich der PI-Werte im Makro- und Mikrotest (Tab. 9a)

Bei 26 Kindern zwischen 2 und 15 Jahren wurde der Phagozytoseindex (PI) zum gleichen Zeitpunkt nach dem Makro- und Mikroverfahren ermittelt.

Diskutiert wurde die Frage: Kann der Mikrotest als Ersatz für den Makrotest zur PI-Bestimmung herangezogen werden, ggfls. unter welchen Bedingungen.

Die Ergebnisse sind in Tab. 9a wiedergegeben. Die Grafiken 9a und 9b zeigen die PI-Werte beim Makro- und Mikrotest im Vergleich. Im Makrotest steigt der PI mit Poolserum nach 45 Min. bei allen 26 Probanden, mit dem Eigenserum wird in 2 Fällen ein Abfall beobachtet, in einem Fall ist der Wert praktisch unverändert.

Im Mikrotest steigt der PI beim Poolserum in 15 Fällen, in 8 Fällen sinkt er, in 3 Fällen ist er praktisch unverändert. Mit dem Eigenserum wird in 17 Fällen ein Anstieg, in 5 Fällen ein Abfall beobachtet, in 3 Fällen gleichbleibender PI, ein Präparat konnte infolge Zytolyse nicht ausgewertet werden.

Abb. 10 gibt die mittleren PI-Werte wieder. Erwartungsgemäß sind die Indices bei längerer Dauer größer. Die Änderung ist beim Mikrotest trotz geringerer Zeitdifferenz vor allem beim Eigenserum

größer (s. auch Abb. 9a u. 9b). Die mittleren Werte für Pool- und Eigenserum sind beim Makrotest etwa gleich groß, im Mikrotest liegen die PI-Werte beim Eigenserum unter denen des Poolserums.

Der physiologische Bereich für den PI liegt im Makrotest bei

4.41 ± 0.87 PS 15 Min.
5.13 ± 0.60 PS 45 Min.
4.35 ± 1.20 ES 15 Min.
5.14 ± 0.86 ES 45 Min.

im Mikrotest bei

4.25 ± 0.73 PS 20 Min.
4.53 ± 0.73 PS 30 Min.
3.56 ± 1.01 ES 20 Min.
4.43 ± 1.01 ES 30 Min.

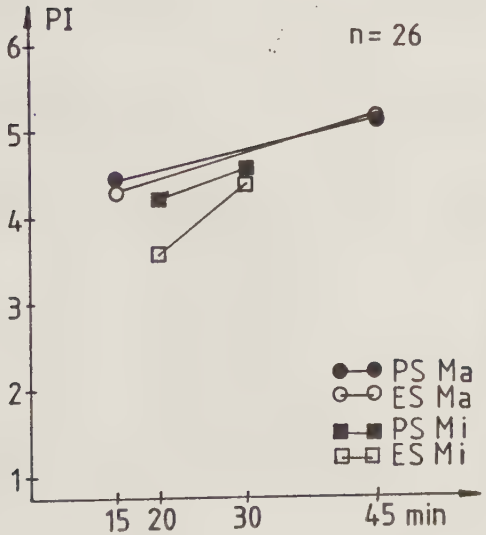


Abb. 10: Phagozytosemittelwerte im Makro- und Mikrotest

Tab. 9a: PI-Werte mit Pool- und Eigenserum im Vergleich Makrotest/Mikrotest

			Makrotest				Mikrotest			
			Pool		ES		Pool		ES	
Name	geb.	Geschl.	15	45	15	45	20	30	20	30
M.Kl.	28. 4.75	m	6.02	6.82	6.78	6.94	4.55	4.60	3.98	3.27
M.Kr.	13.12.67	f	3.80	4.43	3.93	4.77	3.77	3.96	3.61	4.04
A.B.	19. 3.71	m	4.23	5.21	4.69	4.41	3.88	4.72	4.19	4.09
D.B.	23. 2.69	m	3.96	4.36	3.92	4.60	3.51	4.40	3.47	4.03
D.J.	1. 4.76	m	4.75	4.82	4.87	4.23	4.50	4.81	4.11	5.18
N.Z.	13.12.65	f	3.94	5.02	3.99	4.76	3.74	3.79	2.93	2.51
S.P.	20. 4.66	f	5.29	5.71	4.86	5.35	4.82	5.85	4.24	5.60
R.B.	20. 1.72	m	4.29	5.11	3.34	4.57	4.27	5.00	3.91	4.96
S.H.	9. 7.70	f	4.97	5.29	5.16	5.73	4.44	5.15	4.51	5.17
C.B.	25. 4.69	f	4.08	4.19	1.41	2.54	3.85	3.66	1.90	2.12
S.B.	5. 5.68	m	4.99	5.10	4.93	5.61	4.72	5.60	5.42	5.11
T.F.	27. 3.64	m	1.37	4.86	1.12	5.08	3.35	3.93	1.88	3.55
J.U.	8. 9.65	m	4.60	4.79	4.58	5.40	4.26	4.75	4.52	6.19
M.S.	19. 8.66	m	4.94	5.79	5.39	5.62	4.30	4.29	3.83	3.87
J.G.	24. 2.66	f	4.18	4.68	3.21	4.79	4.43	5.11	4.26	4.73
A.K.	11. 6.67	m	4.38	5.15	5.08	5.87	3.52	4.15	3.31	4.31
D.P.	22. 5.67	m	4.12	4.98	4.25	6.06	4.16	3.87	3.23	3.29
S.S.	1. 6.67	m	4.49	5.28	4.91	5.57	3.55	4.85	3.40	3.70
G.H.	7. 7.75	m	3.84	4.38	4.19	4.68	2.98	3.77	3.13	4.04
P.B.	4. 1.64	m	3.95	4.67	4.57	5.09	4.52	4.28	3.38	5.17
E.M.	17.12.68	f	3.34	4.50	3.08	3.84	4.70	3.93	3.72	4.23
K-H.L.	8.12.64	m	5.15	5.66	5.51	5.61	6.14	5.87	6.27	5.41
M.R.	2. 9.71	m	5.75	5.86	5.35	6.06	4.74	3.76	5.86	5.80
J.A.	21. 9.71	m	4.35	5.55	4.35	5.35	5.95	5.13	Ø	4.73
M.N.	15. 6.65	f	4.96	5.87	4.98	5.79	3.48	3.12	4.05	4.34
T.B.	8. 3.72	m	4.82	5.42	4.65	5.54	4.39	5.45	4.43	5.76
$\bar{x}$			4.41	5.13	4.35	5.14	4.25	4.53	3.56	4.43
SEM			0.17	0.12	0.24	0.17	0.14	0.14	0.20	0.20
s			0.87	0.60	1.20	0.86	0.73	0.73	1.01	1.01

Abb. 9a: Vergleich der Phagozytoseindices mit Poolserum beim Makro- und Mikrotest im Parallelansatz (n = 26)

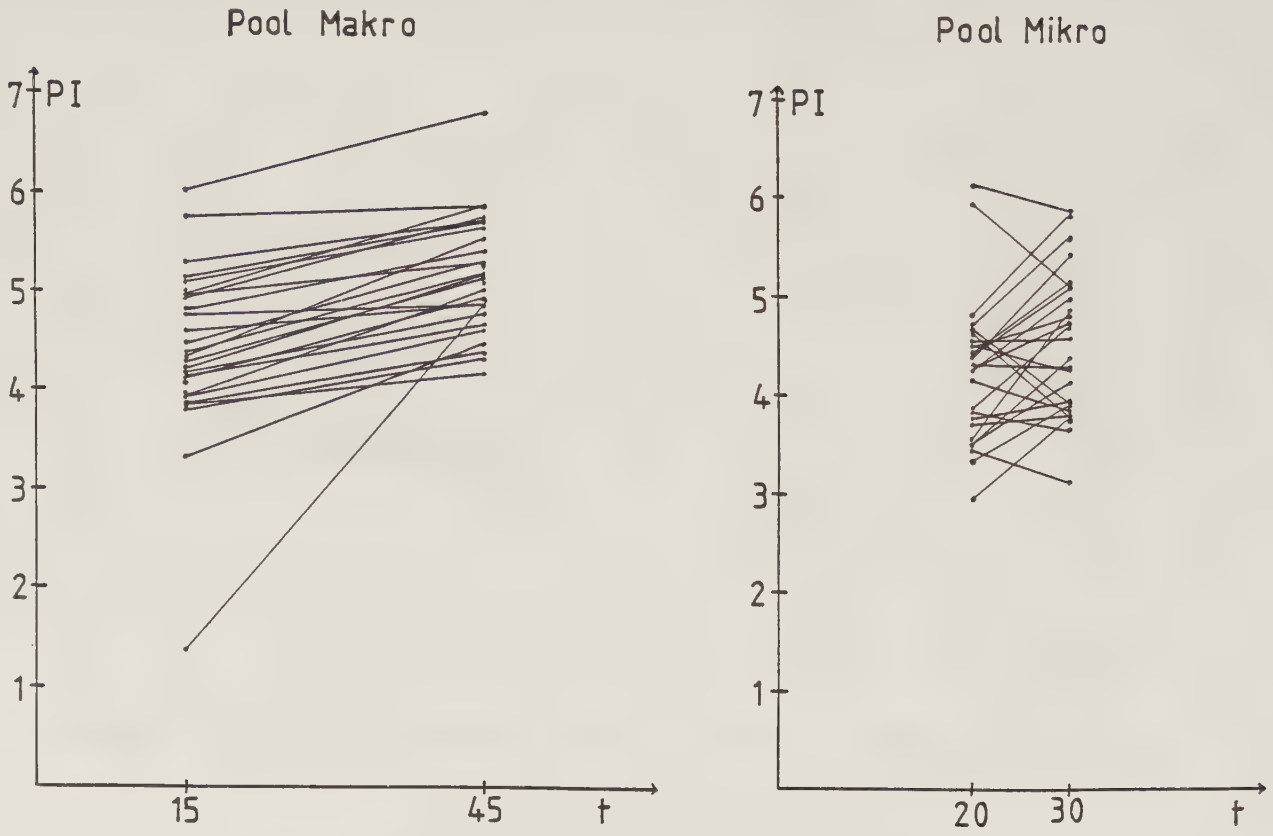
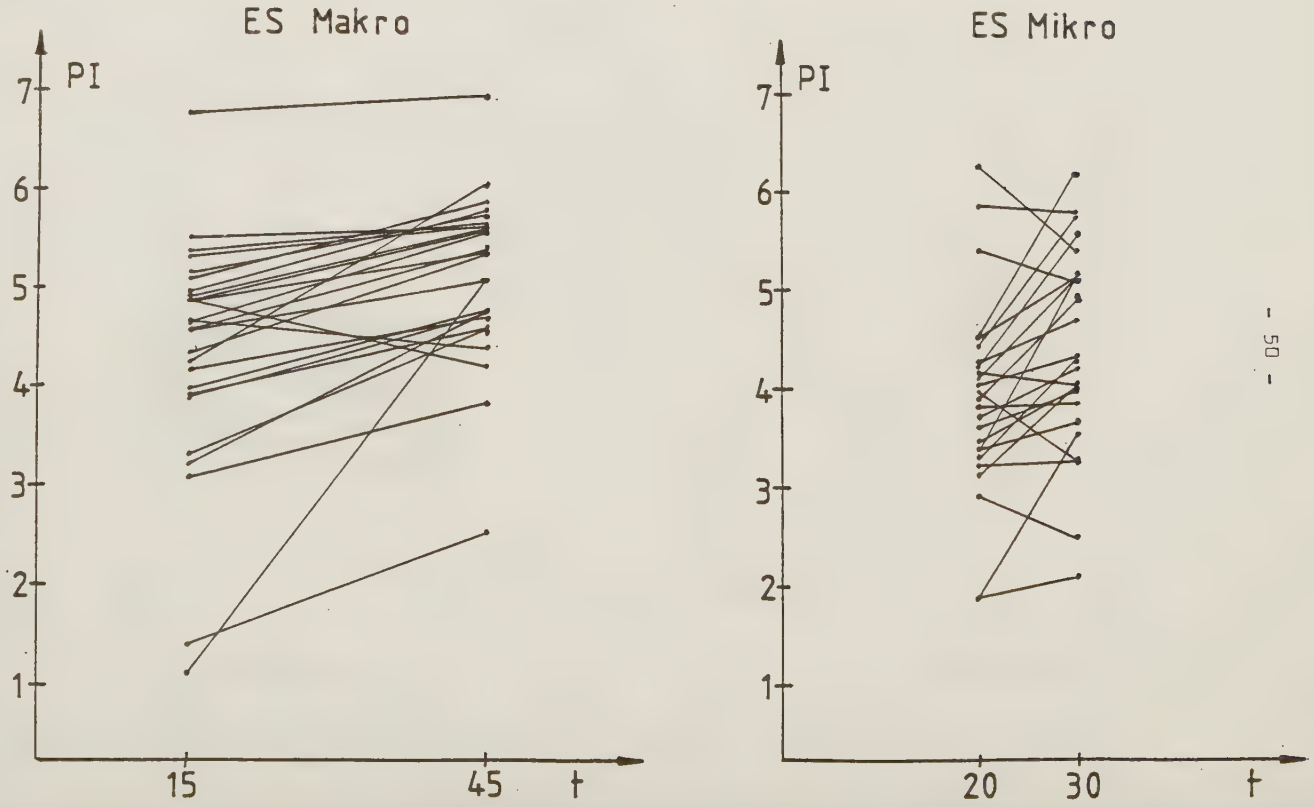


Abb. 9b: Vergleich der Phagozytoseindices mit Eigenserum beim Makro- und Mikrotest im Parallelansatz (n = 26)



6.3.2.2 Korrelationsstatistische Analyse anhand einer linearen Regressionsgeraden

6.3.2.2.1 Vergleich Makro Minimum (15 Min)/Mikro Minimum (20 Min) für Poolserum (Abb. 11)

Der Korrelationskoeffizient (R_{xy}) zwischen Makro- und Mikrotest beträgt 0.435 (n = 26) bei einem Schwellwert von 0.388 (α = 5%; df = 24). Damit werden 18.9 % der Gesamtstreuung durch die lineare Regression erklärt.

6.3.2.2.2 Vergleich Makro Minimum (15 Min)/Mikro Minimum (20 Min) für Eigenserum (Abb. 12)

Der Korrelationskoeffizient (R_{xy}) zwischen Makro- und Mikrotest beträgt 0.634 (n = 25) bei einem Schwellwert von 0.396 (α = 5%; df = 23). 40 % der Gesamtstreuung werden durch die lineare Regression erklärt.

6.3.2.2.3 Vergleich Makro Maximum (45 Min)/Mikro Maximum (30 Min) für Poolserum (Abb. 13)

Der Korrelationskoeffizient (R_{xy}) zwischen Makro- und Mikrotest beträgt 0.279 (n = 26) bei einem Schwellwert von 0.388 (α = 5%; df = 24). Nur 7 % der Datenvarianz würden durch die lineare Regression erklärt. Eine Korrelation ist nicht vorhanden.

6.3.2.2.4 Vergleich Makro Maximum (45 Min)/Mikro Maximum (30 Min) für Eigenserum (Abb. 14)

Der Korrelationskoeffizient (R_{xy}) zwischen Makro- und Mikrotest beträgt 0.304 (n = 26)

bei einem Schwellwert von 0.3888 (α = 5%; df = 24). Nur 9 % der Datenvarianz würden durch die lineare Regression erklärt. Eine Korrelation ist nicht vorhanden.

Abb. 11 Lineare Regression von Pool Mikro$_{Min.}$ versus Pool Makro $_{Min.}$

(R = 0.43 , B = 19 %)

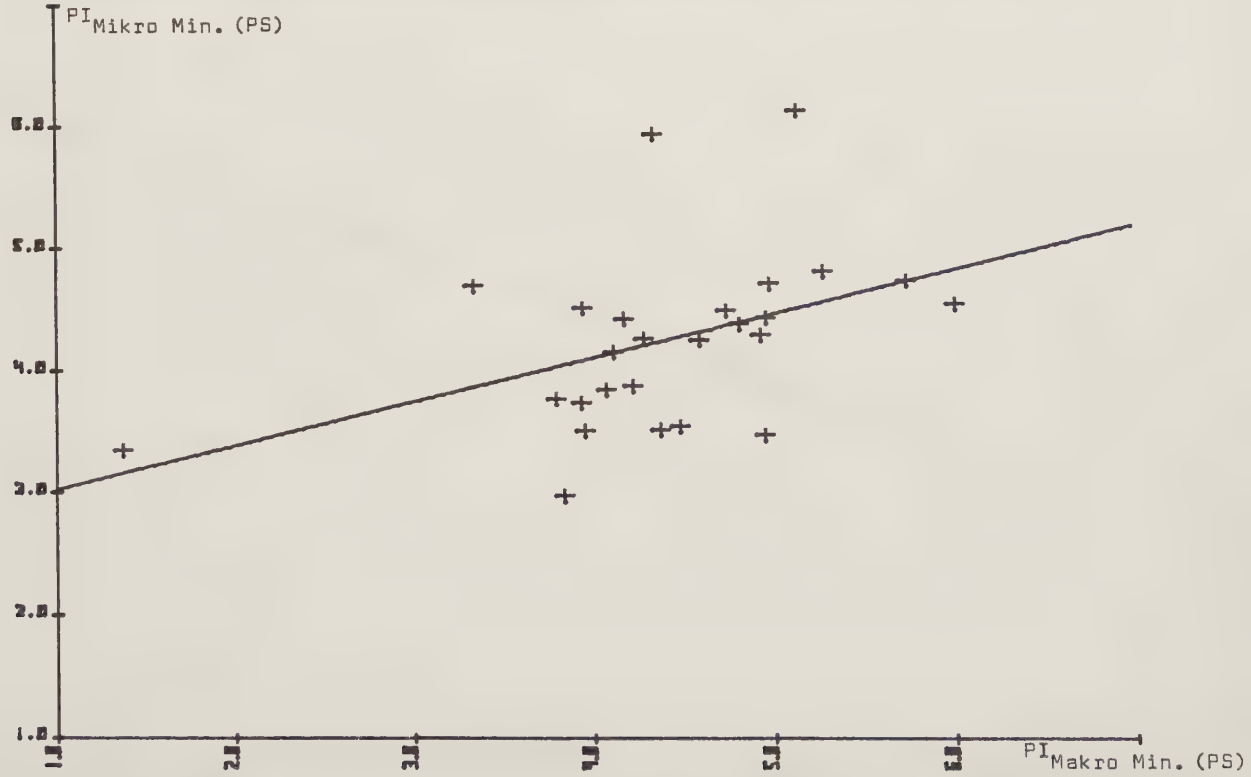


Abb. 12 Lineare Regression von ES $Mikro_{Min.}$ versus ES $Makro_{Min.}$

(R = 0.63 , B = 40 %)

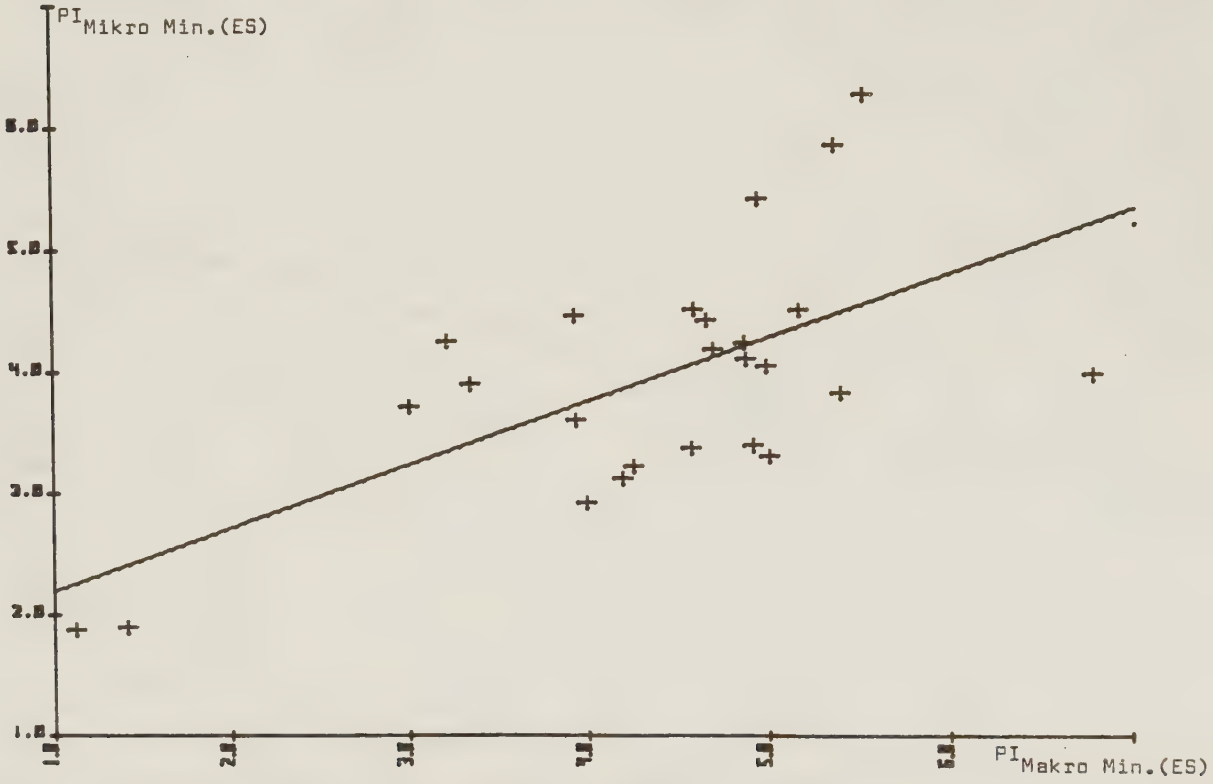


Abb. 13: Lineare Regression von Pool $Mikro_{Max.}$ versus Pool $Makro_{Max.}$
(R = 0.27 , B = 7 %)

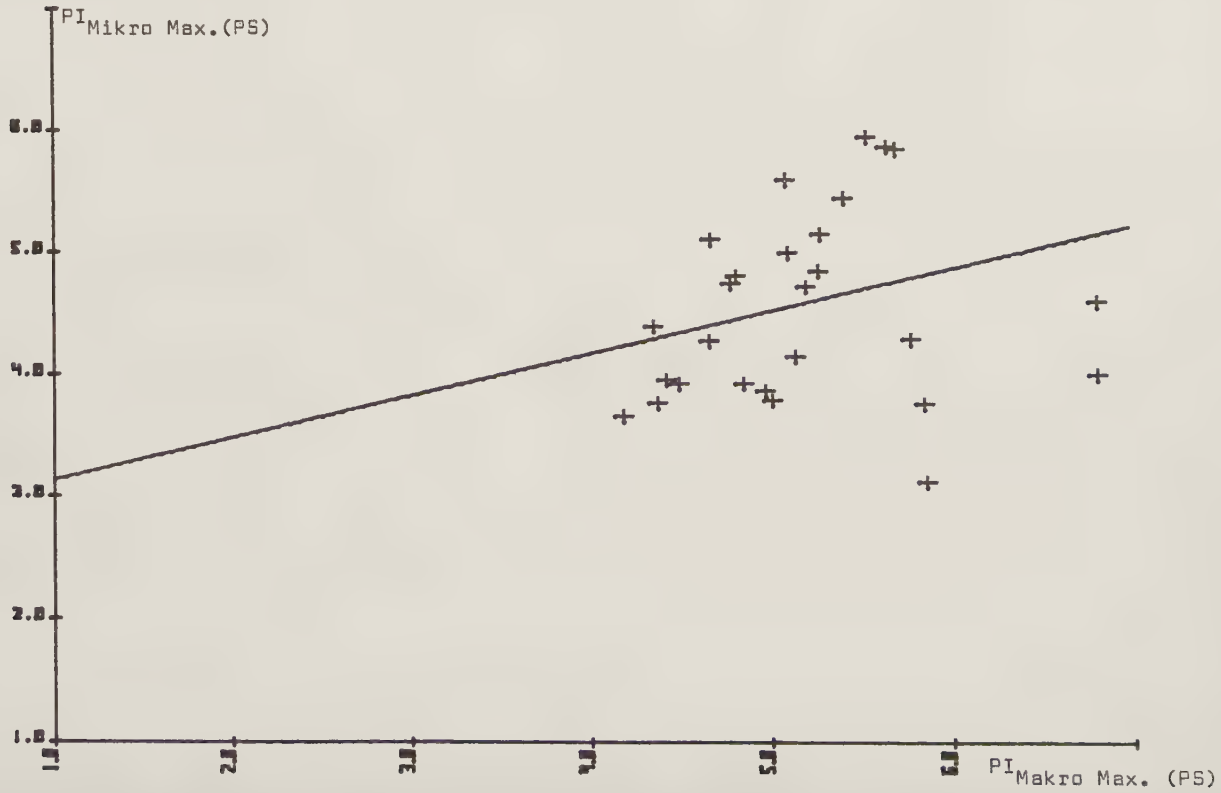
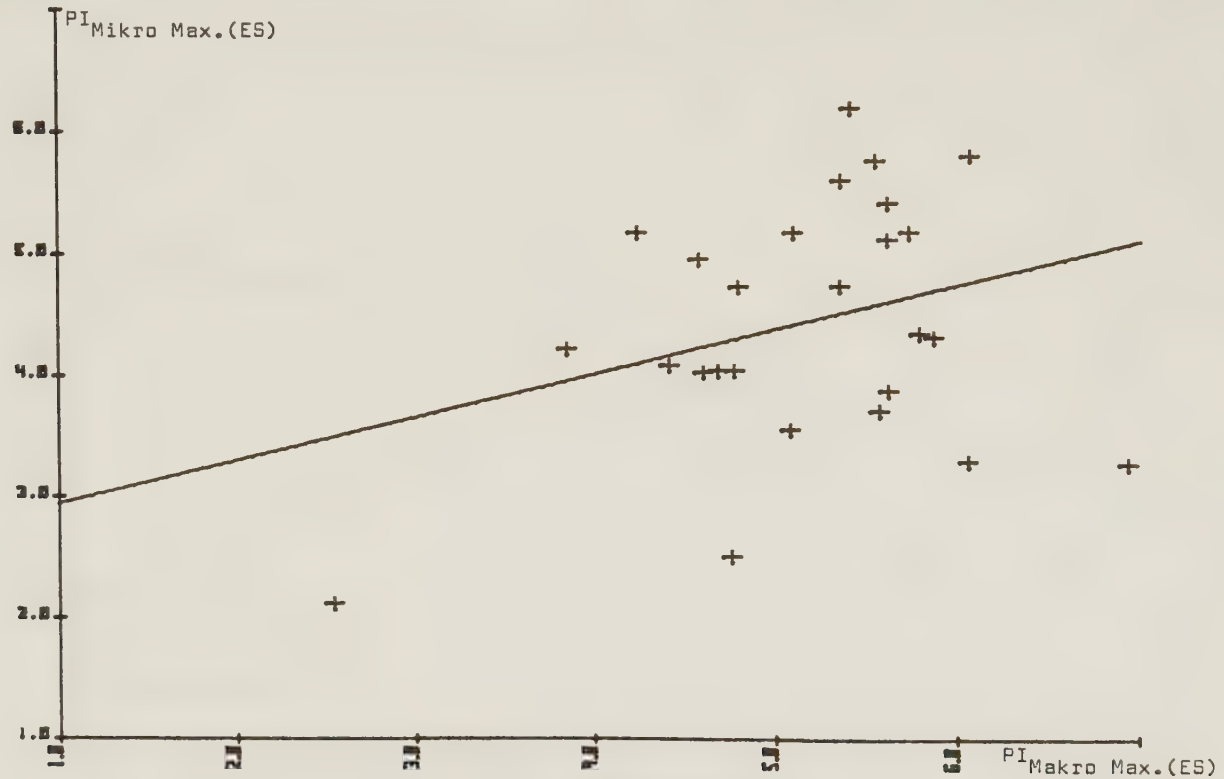


Abb. 14: Lineare Regression von ES $Mikro_{Maximum}$ versus ES $Makro_{Maximum}$

(R = 0.31 , B = 9 %)



6.3.2.3 Hypothesenprüfung charakteristischer Veränderlicher, die mit dem Phagozytoseindex in Verbindung stehen.

6.3.2.3.1 Hypothese: Das Geschlecht beeinflußt die Phagozytose nicht

Von den 26 Probanden waren 18 männlichen und 8 weiblichen Geschlechts.
Als Korrelationen zwischen Phagozytoseindex und Geschlecht wurden Werte zwischen 0.20 und 0.30 gefunden, praktisch nicht signifikant. Herausragender Wert ist lediglich die Korrelation zwischen Geschlecht und PI im Makrotest (ES) bei 45 Min. mit 0.36 (10%-Basis sign.). Tendenziell wird die Hypothese bestätigt.

6.3.2.3.2 Hypothese: Das Alter ab 1. LJ beeinflußt die Phagozytose nicht

Die untersuchten Kinder waren zwischen 1 Jahr und 9 Monate und 14 Jahren und 8 Monate alt. Als Altersmittelwert findet man 9,6 Jahre, wobei die Angabe hinter dem Komma dezimal und nicht als Monate zu interpretieren ist. Vier der Kinder sind zwischen 1.LJ und 6.LJ, die restlichen zwischen 6.LJ und 15.LJ.

Sämtliche Korrelationen sind nonsignifikant. Die Hypothese wird durch die Daten voll bestätigt. Die graphische Darstellung (Abb.15) zeigt keine Altersabhängigkeit des PI im Mittel, jedoch nimmt die Streuung mit wachsendem Alter zu.

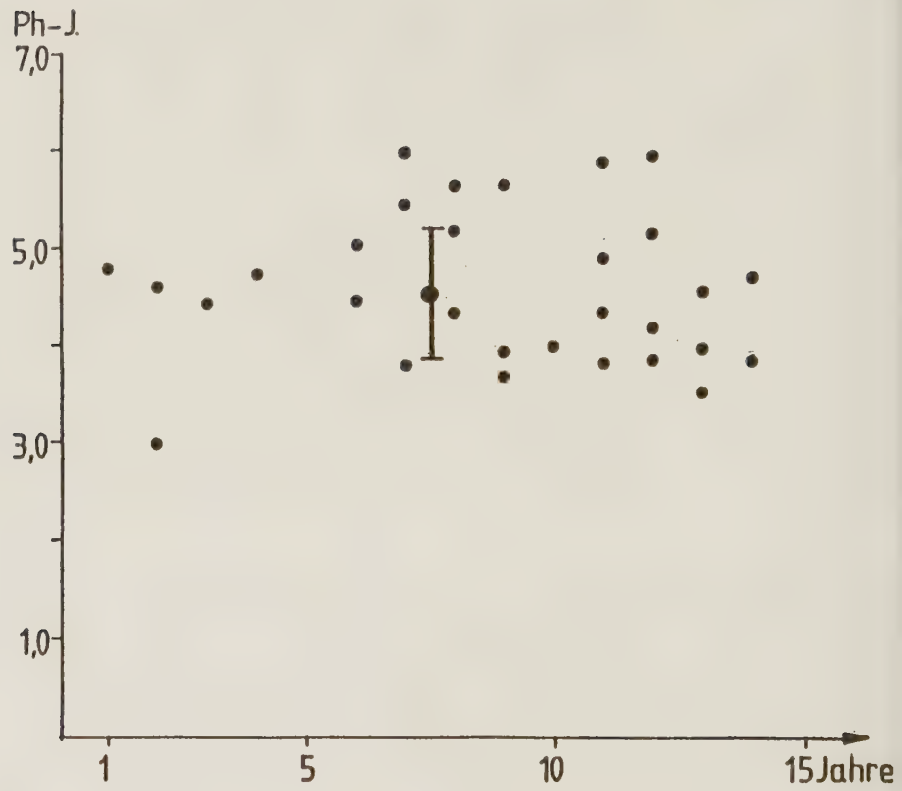


Abb. 15: Phagozytoseindices (Ph-I) in Abhängigkeit vom Lebensalter der Probanden (Mikrotest, 30 Min.)

6.3.2.4 Laborbefunde (Tab. 10)

Ein unmittelbarer Zusammenhang besteht zwischen dem Phagozytoseindex und den in Tab. 10 aufgelisteten blutchemischen Parametern. Es sind folgende Einflüsse nachgewiesen worden:

Hohe Leukozytenzahlen haben eine Verringerung des PI zur Folge, beim Mikrotest wirkt zusätzlich eine zu hohe Granulozytenzahl PI-reduzierend. Die Regressionskoeffizienten liegen zwischen 0.50 und 0.55 (vgl. auch 6.1.2 u. 6.2.4).

Eine wichtige Rolle für die Phagozytose-Vorgang spielen die Serumeiweißkörper. Korrelationen von 0.45 bis 0.55 finden sich vor allem bei IgA, γ und α_1.
Die Regressionsanalysen zeigen im einzelnen folgende Ergebnisse:

Makrotest, PS, 45 Min.:

Signifik. Prädiktoren: Gamma 0.50
α_1 0.30

Varianzerfassung = 30 %, d.h. durch die angegebenen Variablen wird 30 % der Gesamtvarianz des PI erklärt.

Makrotest, ES, 45 Min.:

Signifik. Prädiktoren: IgA 0.45
Varianzerfassung = 34 %

Mikrotest, PS 30 Min.:

Signifik. Prädiktoren: Gamma 0.45
Varianzerfassung = 44 %

Mikrotest, ES 30 Min.:

Signifik. Prädiktoren: Gamma 0.55
α_1 0.60
IgA 0.35

Varianzerfassung = 60 %.

Angesichts der geringen Stichprobenzahlen sind die Regressionsergebnisse nur mit großer Vorsicht interpretierbar; sie müssen noch an einem entsprechend umfangreichen Material ausgebaut und bestätigt werden.

Tab. 10: **Laborbefunde**

Name	Gesamt Leukos	Granulos	C_3	IgG	IgA	IgM	IgE	Prä-Alb.	Alb.	a_1	a_2	ß	y	Ges. Eiweiß
M.Kl.	11.100	60 (6.660)	-	-	-	-	-	0.2	73.3	1.6	7.8	7.7	9.4	8.11
M.Kr.	7.800	53 (4.134)	-	1200	106	166	85	1.6	61.9	3.4	8.4	6.7	18.0	8.07
A.B.	6.300	49 (3.087)	80	1540	102	136	24	-	59.9	2.8	10.4	9.4	16.5	7.4
D.B.	6.500	47 (3.055)	85	680	98	173	33	-	71.6	2.8	8.2	8.7	8.7	7.27
D.J.	7.400	35 (2.590)	72	820	110	124	7	1.3	69.6	2.4	10.6	7.6	8.6	7.6
N.Z.	7.400	51 (3.774)	88	1200	190	204	65	-	65.9	1.6	6.6	8.8	17.1	7.65
S.P.	6.700	33 (2.211)	80	940	120	82	7	-	76.6	1.7	6.1	7.1	8.5	7.98
R.B.	8.500	64 (5.440)	95	1700	254	174	720	0.7	62.6	4.2	12.5	7.3	12.7	7.88
S.H.	4.400	34 (1.496)	84	860	100	89	44	1.5	62.4	3.5	10.5	10.0	12.2	6.75
C.B.	10.200	56 (5.712)	94	1380	254	129	-	0.3	62.5	1.7	8.5	9.6	17.3	9.10
S.B.	5.900	51 (3.009)	78	930	108	132	809	1.4	62.5	4.0	8.8	11.1	12.2	7.64
T.F.	5.300	48 (2.544)	86	660	128	130	265	-	65.4	3.1	9.1	10.2	12.1	7.30
J.U.	6.100	54 (3.294)	67	1000	138	70	70	1.2	64.9	3.2	9.4	9.1	12.1	7.22
M.S.	5.100	47 (2.397)	61	990	196	129	333	0.3	71.9	2.0	7.0	9.4	9.4	7.22
J.G.	8.000	60 (4.800)	101	1380	191	189	30	0.2	67.0	2.9	9.5	8.6	11.7	7.79
A.K.	6.900	45 (3.105)	66	1100	172	52	66	0.6	66.4	2.5	8.9	9.4	12.3	7.87
D.P.	8.300	51 (4.233)	89	1100	138	193	-	-	59.9	2.8	10.4	10.4	16.5	5.10
S.S.	6.100	45 (2.745)	78	920	180	115	24	-	65.0	3.2	9.0	10.7	11.8	7.9
G.H.	9.200	57 (5.244)	-	-	-	-	-	0.7	61.9	2.5	10.2	9.7	15.5	7.3
P.D.	8.800	51 (4.488)	75	940	138	200	298	-	64.4	3.4	10.3	9.9	11.7	8.02
E.M.	7.000	57 (3.990)	92	1140	-	269	378	-	64.5	3.7	10.5	7.9	13.1	7.39
K-H.L.	7.700	56 (4.312)	74	1040	100	194	23	-	72.2	2.7	6.8	6.0	12.0	7.39
M.R.	4.400	66 (2.904)	92	940	<10	173	-	-	65.5	3.0	11.2	9.1	10.8	6.89
J.A.	5.700	45 (2.565)	70	920	142	68	38	-	65.1	3.3	10.8	10.0	10.5	6.93
M.N.	7.600	62 (4.712)	93	1250	114	260	70	-	59.2	3.3	11.7	11.3	14.2	8.11
T.B.	6.800	64 (4.352)	132	1200	166	154	-	-	58.8	3.8	12.6	12.1	12.4	8.36

7. DISKUSSION

Die Prüfung der Phagozytose ist, wenn auch verschiedentlich modifiziert, eine Untersuchungsmethode, die vielfach klinische und experimentelle Anwendung findet. Neben enzymatischen und radioimmunologischen Verfahren kann die Fähigkeit der Granulozyten, Fremdpartikel aufzunehmen, durch Zusetzen einer Partikelsuspension auf eine Leukozytenaufschwemmung in vitro getestet werden. Bisher war die Gewinnung einer ausreichenden Zahl weißer Blutkörperchen nur aus chemisch ungerinnbar gemachtem Blut möglich. Diesem von BRANDT (10) und zahlreichen weiteren Autoren angewandtem Prinzip stellte WEHINGER (81) 1976 ein Verfahren gegenüber, in dem die Isolierung der Granulozyten unter Ausnutzung ihrer Haftfähigkeit auf einer Unterlage erfolgt.

Ziel der vorliegenden Studie war es, diese zwei bekannten Verfahren zur Messung der Phagozytoseleistung humaner Granulozyten unter Berücksichtigung charakteristischer Veränderlicher zu vergleichen und auf ihre Einsatzfähigkeit zu prüfen.

7.1 Diskussion der Makromethode

Bei dem nach BRANDT (10) modifizierten Verfahren (im folgenden als Makrotest bezeichnet) handelt es sich um einen standardisierten Test zur quantitativen Bestimmung der Aufnahme von Hefepartikeln in die Zelle. Er ist relativ zeit- und materialintensiv. Der Arbeitsaufwand von der Blutabnahme bis zur Aus-

wertung beträgt durchschnittlich 3 Stunden. Auch werden die Zellen einer intensiven Behandlung durch Heparinisieren, Zentrifugieren, Waschen und Rotieren unterzogen, was für viele Autoren nicht ohne Bedeutung ist. DITTRICH (15) berichtet über eine Zunahme der morphologisch geschädigten Zellen mit zunehmender Bewegung des Blutes. Stoffwechselveränderungen in Form eines Glykolyseanstiegs nach mechanischen Einwirkungen auf die Zelle wiesen 1955 MARTIN et al (52) nach. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen BRÜCKEL und REMMELE (13). Vor zu starken Manipulationen des Zellmaterials haben auch ESMANN (19) und TULLIS (73) gewarnt.

Die Verwendung eines rotierenden Systems geht auf FENN (21) zurück. Nach seinen Untersuchungen ist die Phagozytose proportional der Kollisionswahrscheinlichkeit zwischen Partikel und Zelle. MUDD et al (57) bestätigen diese Befunde. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von JACOBS (37) und BOYDEN et al (8); letztere schließen eine Schädigung der Zellen durch ständiges Rotieren nicht aus.

Wir haben den Einfluß eines rotierenden Systems an 11 Probanden untersucht (Tab. 2). Vergleichende Messungen mit bzw. ohne 15minütiges Rotieren ergaben sowohl mit Pool- als auch mit Eigenserum keinen signifikanten Unterschied der PI-Werte, so daß u.E. auf ein rotierendes System verzichtet werden kann. Der Vorteil liegt einmal in einer Vereinfachung der Untersuchungsmethode, zum anderen in der Herabsetzung vermeidbarer Zellmanipulationen.

Der Makrotest ist durch eine genaue Einstellung der Granulozyten auf 5 x 10^6 Zellen/ml standardisiert. Die Notwendigkeit einer konstanten Partikel/Granulozytenzahl wurde bereits 1932 von JUNG (39) erkannt und in den folgenden Jahren von zahlreichen Autoren bestätigt. Die in Tab. 3 und Abb. 5 dargestellten Ergebnisse zeigen ebenfalls eine signifikante Erniedrigung des PI-Wertes mit steigender Granulozytenzahl.

Die Vorteile der Makromethode liegen vor allem in der Standardisierung des Tests, im physiologischen Ablauf der Phagozytose unter Gewebekulturbedingungen und in der im Vergleich zum nachstehend diskutierten Mikrotest größeren Zeitspanne zwischen Blutentnahme und Durchführung des Tests. Diesbezügliche Studien von BRANDT (10) zeigen bis zu 150 Min. nach Blutentnahme keine Beeinträchtigung der Granulozytenaktivität.
Nachteilig ist die intensive Behandlung der Zellen, der relativ große Materialeinsatz und Zeitaufwand von mind. 3 Stunden. Damit kann die Makromethode nicht als Routineuntersuchung eingesetzt werden. Für seine Durchführung ist ärztliches Hilfspersonal erforderlich.

Eine Vereinfachung der Makromethode ist durch den Verzicht auf ein rotierendes System möglich.

7.2 Diskussion der Mikromethode

Die von WEHINGER (81) 1976 eingeführte Untersuchungsmethode (im folgenden als Mikrotest bezeichnet) ist ein verhältnismäßig neuartiges Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Phagozytoseleistung neutrophiler Granulozyten. Die Durchführung ist einfach, zeit- und materialsparend. Im Gegensatz zum Makrotest werden unter Verwendung von Poolserum nur 1-2 Tropfen Blut benötigt, ein Vorteil, der besonders in der Pädiatrie stark ins Gewicht fällt. Der Arbeitsaufwand von der Blutentnahme bis zur Auswertung beträgt durchschnittlich 1 1/2 Stunden. Die Verarbeitung des Materials hat wegen einsetzender Gerinnungsvorgänge unmittelbar zu erfolgen; bereits 15 Minuten nach Entnahme konnten wir das Blut nicht mehr zur Durchführung des Tests verwenden. Die Verzögerung bzw. Aufhebung der Gerinnung durch ein Antikoagulans ist im Mikrotest nicht möglich, da mit Eintritt der Gerinnungslosigkeit des Blutes auch die Klebrigkeit der Granulozyten verlorengeht. Diesbezügliche von BAUDISCH (3) gemachte Beobachtungen konnten wir in Vorversuchen unter Verwendung von EDTA bestätigen.

Ein großer Vorteil liegt in der äußerst schonenden Behandlung der Zellen. Da die Zellisolierung aufgrund der Adhäsionskraft der Granulozyten erfolgt, lassen sich die üblichen mechanischen und chemischen Einwirkungen auf die Zellen weitgehend vermeiden. Auf der anderen Seite bleiben aber auch zahlreiche Erythrozyten auf dem Objektträger haften, was nach JACOBS (37) eine geringere Phagozytoseleistung zur Folge hat. BRANDT (10) hat diese

Beobachtung bestätigt, und auch unsere Untersuchungen zeigen im Mikrotest überwiegend niedrigere PI-Werte. Möglicherweise ist die in der Literatur (BERRY u. SPIES (4,5)) beschriebene hohe Phagozytoseleistung in anämischem Blut auf diese Tatsache zurückzuführen.

Im Gegensatz zum Makrotest ist eine genaue Einstellung der Granulozytenzahl im Mikrotest nicht möglich. Eine gewisse Standardisierung wird durch Verwendung eines genau definierten Blutvolumens (2 Tropfen) und einer definierten Keimzahl von 4.0 - 4.2 x 10^7 Hefepartikel/ml gewährleistet. Die Methode ließe sich unter Umständen weiter quantifizieren

a) durch Feststellung der Granulozytenzahl pro Flächeneinheit unter Verwendung eines mit Maßeinheiten versehenen Rasters;

b) durch vorgegebene Vertiefungen im Objektträger, die die Lösungen auf eine bestimmte Flächeneinheit begrenzen.

In eigenen Untersuchungen konnten wir die in der Literatur übereinstimmend festgestellte Notwendigkeit einer konstanten Partikel/Granulozytenzahl im Makrotest feststellen (Tab. 3). Analog dazu haben wir anhand der Partikelverdünnung (Tab. 7) auch im Mikrotest eine signifikante Erniedrigung der PI-Werte mit absteigender Partikelkonzentration nachgewiesen. Wir wissen, daß kurzfristige Reize von charakteristischen Schwankungen der vegetativen Lage und damit auch der Zellzahl begleitet sind. Nachdem die bisher praktizierte Mikromethode keine genaue Granulozyteneinstellung ermöglicht, besteht für den Mikrotest im derzeitigen Versuchsstadium stets die Gefahr einer wechselnden Zahl der Leukozyten und damit stets ungleiches Verhältnis zwischen Granulozyt

und Partikel. Inwieweit biologische Gegebenheiten den Mikrotest tatsächlich beeinflussen, haben wir verschiedentlich untersucht.

Ausgehend von der "biologischen Leukozytenkurve" (SCHILLING (68)) im Rahmen der "vegetativen Gesamtumschaltung (HOFF (33)) untersuchten wir 12 Probanden zu zwei verschiedenen Tageszeiten in einem Intervall von 3 1/2 Stunden. Die Ergebnisse (Tab. 4) zeigen eine tageszeitliche Konstanz im Mikrotest während dieser Zeitspanne. Bei einem 13jährigen Mädchen, das sich freiwillig sechsmal zur Blutabnahme zur Verfügung stellte, zeigt sich ein leichter Abfall der PI-Werte gegen Abend (Tab. 5). Bemerkenswert ist auch ein leichtes Absinken der PI-Werte nach Nahrungsaufnahme. Als Erklärung bietet sich einmal die von MOLESCHOTT (56) beschriebene "Verdauungsleukozytose" an, zum anderen ein Zusammenhang mit der nach Nahrungsaufnahme erfolgenden Insulinausschüttung, die ebenfalls zu einer Verminderung der Phagozytose führt (LÖVEI und LUDANY et al (47,48,49)). Allerdings handelt es sich hier um einen Einzelfall, so daß es bedenklich wäre, diesen Befund zu verallgemeinern. Mit Rücksicht auf die mit wiederholten täglichen Butabnahmen verbundene Belastung der Kinder haben wir auf die Fortführung dieser Testreihe verzichtet.

Bei Betrachtung beider Testverfahren fallen die jeweils unterschiedlichen Inkubationszeiten auf (vgl. S. 13). Die Standardzeiten im Makrotest liegen bei 15 und 45 Minuten, im Mikrotest bei 20 und 30 Min.. Beide Autoren (BRANDT (10), WEHINGER(81)) stellen eine ansteigende Phagozytose mit fortschreitender

Inkubationszeit fest, wobei einschränkend gesagt werden muß daß BRANDT (10) seine Aussage auf das Ergebnis von lediglich zwei Probanden stützt. Unsere Untersuchungen liefern widersprüchliche Befunde (Tab. 6a u. 6b). Ein eindeutiger Maximalwert ist nicht auszumachen. Nach den Ergebnissen in Tab. 6a findet die größte Phagozytoseaktivität zwischen 10 und 20 Minuten statt. Bei längerer Inkubation ist vor allem mit Poolserum wieder ein Rückgang der Phagozytoseleistung zu beobachten. Dies läßt den Schluß zu, daß der Zeitpunkt der Auswertung mit 20 und 30 Min. zu spät gewählt ist.
Auch ist zu berücksichtigen, daß der Test auf dem Objektträger bei Zimmertemperatur abläuft. Die Zellen befinden sich außerhalb ihres Milieus und sind vermehrt exogenen Faktoren (pH-Verschiebung, Oberflächenspannung, Komplementinaktivierung etc.) ausgesetzt. Die Durchführung des Tests bei 37°C (Brutschrank) könnte zu einer Verringerung dieser Faktoren führen und damit eine weitere Fehlerquelle ausschalten.

Die Ergebnisse der beiden Probanden Z.N. und M.E. zeigen zwei Kurvengipfel (Abb. 6a). Es bieten sich vier Interpretationsmöglichkeiten an:

- Phagozytierende Zellen sterben ab, wodurch die noch verbleibenden Phagozyten zu stärkster Aktivität angeregt werden;
- zwei Zellpopulationen wirken auf die Phagozytose ein;
- ein Startermechanismus tritt inkraft;
- die Phagozyten setzen einen sog. Phagozytose stimulierenden Faktor (PSF) frei, der nach ISHIBASHI und

YAMASHITA 60 Min. nach Beginn der Phagozytose das Maximum erreicht (36).

Das Prinzip der Mikromethode beruht auf der Fähigkeit der Granulozyten, an definierten Oberflächen zu haften. Wie schon frühere Untersuchungen von v. PHILIPSBORN (64,65) gezeigt hatten, besitzen Granulozyten z.B. gegenüber einem Objektträger eine beträchtlich höhere Haftungsneigung als Erythrozyten und Lymphozyten. THOMALSKE (71) weist darauf hin, daß diese Haftfähigkeit der Granulozyten einen sehr feinen Indikator zur Beurteilung biologischer Vorgänge im Organismus darstellt. Eine klinische Bestätigung dieser Ansicht liefern die Beobachtungen von BRANDT (11) sowie PENNY und GALTON (63), die eine auffallend geringe Haftfähigkeit bei Zellen von Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie feststellten. Sehr niedrige Klebewerte wurden auch bei Endocarditis lenta gefunden (TISCHENDORF und FRITZE (72)). Auf der anderen Seite steigt die Haftfähigkeit der Zellen während der Schwangerschaft (EUFINGER (20)), schwerer körperlicher Arbeit, Operationstrauma oder starkem Blutverlust (FLECK (23)). Für den Mikrotest bedeutet das u.U. eine Selektion besonders haftfähiger Granulozyten auf dem Objektträger, ein Problem, mit dem sich auch WEHINGER (81) auseinandergesetzt hat.
Einen großen Einfluß auf die Klebrigkeit haben auch Bebrütungsdauer (BAUDISCH (3)) und Temperatur (BAUDISCH (3), GARVIN (24)); dagegen schreibt BAUDISCH (3) der Art und Beschaffenheit der benutzten Unterlage keine oder nur eine geringe Bedeutung zu.

Die Vorteile der Mikromethode liegen in der äußerst schonenden Behandlung der Zellen und in dem geringen Zeit- und Materialaufwand. Dies fällt besonders bei Säuglingen und Kleinkindern ins Gewicht, bei denen es aus technischen Gründen manchmal nicht gelingt, Venenblut durch Punktion zu gewinnen. Unter Verwendung von Poolserum genügen 2 Tropfen Blut aus der Ferse zur Prüfung der Phagozytoseleistung der Granulozyten. Damit kann der Test auch auf Neugeborene angewendet werden.

Von erheblichem Nachteil ist die geringe Standardisierung des Tests und die Gefahr einer Selektion besonders haftfähiger Zellen auf dem Objektträger. Dies hat zur Folge, daß möglicherweise nur größere Defekte der Phagozytose erkannt werden können (vgl. WEHINGER (81)). Nachteilig ist auch die Notwendigkeit der sofortigen Verarbeitung wegen einsetzender Gerinnungsvorgänge. Ferner findet die Phagozytose nicht unter Gewebekulturbedingungen statt, so daß der Einfluß exogener Faktoren wie Temperatur, pH-Verschiebungen, Oberflächenspannung, Komplementinaktivierung etc. zu berücksichtigen ist. Eine Verbesserung der Mikromethode kann erreicht werden

1. durch bessere Quantifizierung des Tests mit Hilfe eines Raster-Mikroskops;
2. durch Verwendung von Objektträgern mit vorgegebenen Vertiefungen;
3. durch Inkubation bei 37^{o}C (Brutschrank) zur Verringerung exogener Einflüsse.

7.3 Diskussion Makrotest/Mikrotest im Vergleich

Beim Studium der Phagozytose muß berücksichtigt werden, daß die an Zellen gebundenen Vorgänge mit den humoralen Prinzipien eine große Einheit bilden. Es gilt inzwischen als erwiesen, daß die im Serum enthaltenen Opsonine die Phagozytose humaner Granulozyten positiv beeinflussen. In den Versuchsablauf wird Eigenserum und zur Standardisierung des Tests ein mit immun- und proteinchemischen Methoden definiertes Poolserum eingesetzt. In Anlehnung an BRANDT (10) und WEHINGER (81) wird der Makrotest mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1:5, der Mikrotest im Verhältnis 1:6 verdünnt. Inwieweit unterschiedliche Ergebnisse beider Methoden auf den Verdünnungsfaktor zurückzuführen sind, haben wir in einer ansteigenden Verdünnungsreihe geprüft (s. Tab. 8a u. 8b).

Nach unseren Ergebnissen scheint der Verdünnungsfaktor bei beiden Methoden nur in einem sehr hohen Bereich eine Rolle zu spielen. Die Grenzbereichstitration liegt bei einer Verdünnung von 1:20. In ihren Versuchen mit tierischen Granulozyten finden MUDD et al (57) gute Phagozytose-Ergebnisse bei noch stärkerer Verdünnung (1:64). Im Gegensatz dazu stellt MATOTH (50) bei humanen Granulozyten Neugeborener eine abnehmende Phagozytoseleistung mit ansteigender Serumverdünnung von 1:3 auf 1:12 fest.

In unserer Versuchsreihe ist unter Zugabe von reinem NaCl im Makrotest nahezu keine Phagozytose nachweisbar, im Mikrotest wird ein noch im Normbereich liegender Wert von 2.98 gemessen. Dieser scheinbare Widerspruch ist u.E. darauf zurückzuführen, daß das

in den 2 Tropfen Vollblut enthaltene Serum bereits die nötige Komplementmenge zur Aktivierung der Phagozytose enthält. Auch ist zu bedenken, daß der Phagozytosevorgang im Mikrotest dadurch erleichtert wird, daß die Hefepartikel direkt auf die am Objektträger haftenden Granulozyten fallen, während im Makrotest die Phagozytose in einem rotierenden System stattfindet. Nach den uns vorliegenden Ergebnissen (vgl. S.63 und Tab. 2) ist der Einfluß des Rotors jedoch zu vernachlässigen.

Die Ergebnisse der klinischen Studie zeigen, daß auf die Anwesenheit von Serum bei der Phagozytose nicht verzichtet werden kann. Diese Tatsache wird heute allgemein bestätigt (BRANDT (10), FENN (21), WEHINGER (81), TULLIS (74), ROBINEAUX (66), SBARRA u. KARNOVSKY (67), WRIGHT u. DOUGLAS (85) u.a.). Die dafür erforderlichen Proteinmengen sind sehr gering. Bis zu einer Verdünnung von 1:20 liegen die Werte im Normbereich. Für die Praxis bedeutet das, daß die zur Durchführung des Tests notwendige Blutmenge ohne Beeinträchtigung der Ergebnisse reduziert werden kann.

In der Literatur finden sich nur wenig Hinweise über die Bedeutung des Lebensalters und Geschlechts der untersuchten Personen für die Phagozytose. Nach TULLIS (73) und MATOTH (50) ist die Phagozytoseaktivität kindlicher Granulozyten um ca. 55 % geringer als bei Erwachsenen. GLUCK und SILVERMAN (25) finden keinen Unterschied, MIYAMOTO (55) berichtet über eine geringere Phagozytoseleistung nur bei Frühgeborenen. Innerhalb der Altersgruppe von 2 bis 15 Jahren zeigen unsere Untersuchungen keine altersabhängigen Unterschiede. Auch das Geschlecht scheint die Phagozytoseleistung nicht

zu beeinflussen. Diese Erkenntnisse sollten allerdings noch an einem entsprechend umfangreichen Material bestätigt werden. Funktionelle Unterschiede waren in Abhängigkeit von der Gesamtleukozytenzahl im peripheren Blut und den Serumfaktoren nachweisbar.

In einer an 26 Probanden durchgeführten Vergleichsuntersuchung wurde ermittelt, ob und in welchem Umfang der Mikrotest als Ersatz für den Makrotest zur Bestimmung der Phagozytoseleistung humaner Granulozyten herangezogen werden kann. Trotz der unterschiedlichen Methodik liefern beide Verfahren auf den ersten Blick überraschend ähnliche Ergebnisse (Tab. 9a). Den physiologischen Bereich für den Phagozytoseindex im Makro- und Mikrotest zeigt nachstehendes Schema:

Probanden n = 26	Makrotest 15	Makrotest 45	Mikrotest 20	Mikrotest 30
Mittelwert	4.41(PS) 4.35(ES)	5.13(PS) 5.14(ES)	4.25(PS) 3.56(ES)	4.53(PS) 4.43(ES)
Standard-abweichung	0.87(PS) 1.20(ES)	0.60(PS) 0.86(ES)	0.73(PS) 1.01(ES)	0.73(PS) 1.01(ES)
höchster Wert	6.02(PS) 6.78(ES)	6.82(PS) 6.94(ES)	6.14(PS) 6.27(ES)	5.87(PS) 6.19(ES)
tiefster Wert	1.37(PS) 1.12(ES)	4.19(PS) 2.54(ES)	2.98(PS) 1.88(ES)	3.12(PS) 2.12(ES)

Der statistische Vergleich (s. Regressionsanalyse S. 51) ergibt jedoch nicht in allen Testreihen eine signifikante Übereinstimmung. Am größten ist die Korrelation beim Vergleich der Wertepaare, bei denen die Inkubations-

zeiten nur geringfügig differieren, d.h. beim Vergleich Makro Minimum (15 Min.) mit Mikro Minimum (20 Min.) für Pool- und Eigenserum. Dies legt den Schluß nahe, daß auch beim Vergleich der Maximalzeiten (45 bzw. 30 Min.) eine größere Korrelation erzielt werden könnte, wenn beide Verfahren auf eine maximale Inkubationszeit reduziert würden. Auf der anderen Seite lassen die optisch ähnlichen Resultate vermuten, daß die Testsysteme nicht an ihre Grenzleistung herangeführt wurden. Durch ein zu großes Partikelangebot und eine zu lange Inkubationszeit (vgl. S. 68) konnte im Rahmen einer gewissen Streubreite genügend phagozytiert werden, so daß intraindividuelle Schwankungen nicht aufgedeckt wurden. Würde man die Methoden

1. durch die Wahl einer kürzeren und einheitlichen Inkubationszeit,
2. durch eine geringere Keimeinsaat

stärker belasten, so ließen sich u.U. auch leichtere Granulozytendefekte, ein circadianer Rhythmus und postprandiale Veränderungen nachweisen.

In zwei Fällen wurden mit beiden Methoden ungewöhnlich niedrige Phagozytoseindices gemessen. Proband C.B. (Tab. 9a) liegt mit einem PI von 1.41 (Makrotest) bzw. 1.90 (Mikrotest) im Eigenserum unterhalb der Norm. Bei normalem Phagozytoseverhalten im Poolserum weist dieser Befund auf eine Opsonierungsschwäche hin. Bei Proband T.F. (Tab. 9a) sind sowohl im Pool- als auch im Eigenserum die Phagozytoseindices bei 15 bzw. 20 Min. erniedrigt. Dies läßt sich durch eine im Rahmen eines physiologischen Tiefpunkts aufgetretene Granulozytenschwäche erklären. Durch eine

verlängerte Inkubationszeit wird diese Granulozytenschwäche voll kompensiert.

Die wesentlichen Kriterien beider Methoden sind nachstehend aufgeführt (s. S. 76).
Aufgrund dieser methodischen Unterschiede ergeben sich für beide Verfahren unterschiedliche Einsätze:

a) Der Makrotest eignet sich aufgrund der besseren Standardisierung für Verlaufkontrollen und zur Wirksamkeitsüberprüfung von Medikamenten.

b) Der Mikrotest ist als Screening-Methode von Interesse. Die Ergebnisse können nur zur schnellen Orientierung dienen. Durch den geringen Materialaufwand ist er besonders für die Pädiatrie geeignet.

Makrotest und Mikrotest im Vergleich. Wesentliche Kriterien der beiden Verfahren zur Messung der Phagozytoseleistung humaner Granulozyten.

	Makrotest	Mikrotest
Zellisolierung	erhebliche Manipulation (durch Waschen, Zentrifugieren etc.)	geringe Manipulation (Vollblut direkt auf Objektträger)
Verarbeitung	zu einem späteren Zeitpunkt möglich	sofort
Volumen	10-15 ml Nativblut	3-4 ml Nativblut
Phagozytose	unter Gewebekulturbedingungen bei 37°C	auf dem Objektträger bei Zimmertemp.(24°C)
Inkubationszeit	15 bzw. 45 Minuten	20 bzw. 30 Minuten
Arbeitszeit	ca. 3 Stunden	ca 1 1/2 Stunden
Standardisierung	optimal	wenig

8. ZUSAMMENFASSUNG

Aus klinischen Gesichtspunkten ist es mitunter notwendig, die Phagozytose als Grundleistung der Granulozyten zu überprüfen. Dafür standen uns zwei bekannte Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Aufnahme von Partikel in die Zelle zur Verfügung. Aus 80 Untersuchungen klinisch "gesunder" Kinder zwischen 2 und 15 Jahren wurde der Phagozytoseindex (PI) unter Berücksichtigung charakteristischer Veränderlicher ermittelt und beide Methoden auf ihre Einsatzfähigkeit geprüft.

Beim Makrotest handelt es sich um einen standardisierten Test mit einem relativ großen Zeit- und Materialaufwand. Der Ablauf der Phagozytose erfolgt unter Gewebekulturbedingungen. Die Notwendigkeit einer definierten Granulozyteneinstellung konnte bestätigt werden (6.1.2). Eine Vereinfachung dieser Untersuchungsmethode und eine Herabsetzung vermeidbarer Zellmanipulationen ist durch Verzicht auf ein rotierendes System möglich (6.1.1).

Der Mikrotest ist ein relativ einfaches, zeit- und materialsparendes Verfahren. Die Durchführung des Tests hat wegen einsetzender Gerinnungsvorgänge sofort zu erfolgen. Eine genaue Einstellung der Granulozytenzahl ist beim Mikrotest im derzeitigen Versuchsstadium nicht möglich. Die signifikante Erniedrigung des PI mit Verringerung der Partikelzahl beweist eine relativ konstante Haftfähigkeit der Granulozyten auf dem Objektträger (6.2.4).

Das Maximum der Phagozytose findet innerhalb der ersten 20 Minuten statt (6.2.3). Wesentliche tageszeitliche Schwankungen des PI innerhalb eines Zeitraumes von 4 Stunden konnten nicht festgestellt werden (6.2.1).

Für beide Methoden ist für den Versuchsablauf Serum notwendig. Die dazu erforderlichen Proteinmengen sind erstaunlich gering. Normalwerte werden mit beiden Verfahren in dem Verdünnungsbereich zwischen 1:5 und 1:15 registriert (6.3.1). Damit ist vor allem beim Makrotest eine Verringerung der Blutmenge ohne Beeinträchtigung der Phagozytoseindices möglich. Unter den gewählten Versuchsbedingungen konnte eine Alters- bzw. Geschlechtsabhängigkeit nicht festgestellt werden. Funktionelle Unterschiede zeigten sich in Abhängigkeit von der Gesamtleukozytenzahl und den Serumfaktoren (6.3.2.3).

Beide Methoden eignen sich zur Prüfung der Granulozytenfunktion und der Opsonierung (Tab. 9a). Im direkten Vergleich liegen die Ergebnisse optisch in der gleichen Größenordnung zwischen 3.56 und 5.14. Statistisch ergeben sich jedoch signifikante Unterschiede, die bei den großen methodischen Differenzen nicht anders zu erwarten sind. Methodische Vorschläge zur Verbesserung beider Methoden wurden gegeben (Kap. 7).

Wegen der besseren Standardisierung eignet sich der Makrotest vor allem für Verlaufskontrollen und zur Wirksamkeitsüberprüfung von Medikamenten. Der Mikrotest ist aufgrund des geringen Zeit- und Materialaufwandes als Screening-Methode zur Aufdeckung von größeren Serum- und Granulozytenfunktionsdefekten von Interesse.

9. LITERATURVERZEICHNIS

1. ASHER, L.:
Der Einfluß der inneren Sekretion auf das phagozytäre Vermögen der Leukozyten, geprüft mit der Methode von Fenn.
Biochem. Z. 166, 295-316 (1925)

2. BAUDISCH, W.:
Eliminationsvorgänge der Granulozyten.
In: Aktuelle Leukozytenprobleme
Schriftenreihe Hämatologie u. Bluttransfusionswesen 4
Ed. Plenert, W., Berlin, Akad. Verlag, (1966)

3. BAUDISCH, W.:
Beitrag zur Frage der Klebrigkeit der Leukozyten
Die Naturwissenschaft 44, H.7, 230 (1957)

4. BERRY, L.J., DAVIS J., SPIES, T.D.:
Phagocytic activity of neutrophiles in anemia
J. Lab. clin. Med. 30, 910-916 (1945)

5. BERRY, L.J., SPIES, T.D.:
Phagocytosis
Medicine 28, 239-300 (1949)

6. BESSIS, M.:
Traité de cytologie sanguine
Masson & Co., Paris, 364-365 (1954)

7. BOARD, A.V. Jr., KEMPF, J.E. HANSON, R.J.:
Phagocytosis of influenza virus
J. Immunol. 79, 416-421 (1957)

8. BOYDEN, S.V.:
The occurence and significance of natural antibodies
In: Molecular and Cellular Basis of Antibody Formation
S. 329-340. Academic Press, New York London (1965)

9. BOYDEN, S.V., NORTH, R.J., FAULKNER, S.M.:
Complement and the activity of phagocytes
Ciba Foundation Symposium. Complement, 190-213 (1965)

10. BRANDT, L.:
Studies on the phagocytic activity of neutrophilic leukocytes
Scand. J. Haemat. 2, 1-114 (1967)

11. BRANDT, L.:
Adhesiveness to glass and phagocytic activity of neutrophilic leukocytes in myeloproliferative disease
Scand. J. Haemat. 2, 126-136 (1965)

12. BROGAN, T.D.:
Effect of complement and of the carbohydrate components of sputum on phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes
Immunology 7, 626-638 (1964)

13. BRÜCKEL, K.W., REMMELE, W.:
Atmung und Glykolyse der Leukozyten
Zschr. Vitamin-Hormon-Ferm.forschung 9, 7-14 (1957)

14. BUSSE-GRAWITZ, P.:
Über die Widerstandsfähigkeit des Gewebes gegenüber verschiedenen Schädigungen.
Virchows Archiv f. pathol. Anatomie u. Physiologie
Bd. 308, H.1, 253-262 (1941)

15. DITTRICH, H.:
Grundlegende Funktionen der neutrophilen Granulozyten
In: Physiologie und Physiopathologie der weißen Blutzellen. S. 121-151
Ed. H. Braunsteiner, Stuttgart, Thieme-Verlag (1959)

16. DOMINGUE, G.J., NETER, E.:
Inhibition by lipopolysaccharide of immune phagocytosis of latex particles modified with common antigen of enteric bacteria
Proc. Soc. exp. Biol. 121, 133-137 (1966)

17. DROBYSHEVSKAYA, A.J., PIGAREVSKY, V.F., SMORODINTSEV, A.:
Activity of phagocytic factors in experimental infection of white mice with mouse pneumonia and meningopneumonia virus
Acta virol. 6, 458-470 (1962)

18. ENGLAND, J.M., BAIN, B.J.:
Total and differential leukocyte count
Brit. J. Haemat. 33, 1 (1976)

19. ESMANN, V.:
Carbohydrate metabolism and respiration in leukocytes from normal and diabetic subjects
Universitätsforlaget, Aarhaus, S. 14 (1962)

20. EUFINGER, H.:
Die Klebrigkeit der Leukozyten als klin. Funktionsprüfung in Ihrer Bedeutung für gynäkologische Probleme
Arch. f. Gyn. 149, 630 (1932)

21. FENN, W.D.:
The phagocytosis of solid particles I. Quartz
J. gen. Physiol. 3, 439-464 (1921)

22. FENN, W.D.:
The phagocytosis of solid particles II. Carbon
J. gen. Physiol. 3, 465-482 (1921)

23. FLECK, L.:
La leukergie et son rôle dans l'immunité
Annales de l'Institut Pasteur, Tôme 92 (1957)

24. GARVIN, J.:
Factors affecting the adhesiveness of human leukocytes and platelets in vitro
J. exp. med. 114, 51-73 (1961)

25. GLUCK, L., SILVERMAN, W.:
Phagocytosis in premature infants
Pediatrics 20, 951-957 (1957)

26. HAMBURGER, H.J.:
Physikalisch-chem. Untersuchungen über Phagozyten, ihre Bedeutung von allg. biolog. und path. Gesichtspunkt
J.F. Bergmann-Verlag, Wiesbaden (1912)

27. HAMBURGER, H.J.:
Die Technik des Arbeitens mit Phagozyten zu biologischen Zwecken
In: Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden
Ed. E. Abderhalden, Urban u. Schwarzenberg, Berlin (1927)

28. HARRIS, H.:
Chemotaxis and phagocytosis
In: Functions of the blood
Ed. Macforlane, R.G. und Robb-Smith, A.H.T.S.
Blackwell Scientific Publications, Oxford (1961)

29. HIRSCH, J.G., COHN, Z.A.:
Degranulation of activity in homogenates of rabbit polymorphonuclear
J. Exp. Med. 112, 1005 (1960)

30. HIRSCH, J.G.:
The Digestive Tract of Phagocytic Cells
In: Phagocytic Mechanisms in Health and Disease
Ed. Williams, R.C. and Fudenberg, H.H., Georg Thieme-Verlag, Stuttgart (1972)

31. HITZIG, W.H.
Funktionsstörungen der Granulozyten
Pädiat. Fortbildk. Praxis, Vol 31, 105-113 (1971)

32. HITZIG, W.H.:
Gesunde und kranke Phagozytose: Theorie, Klinik und Laboratoriumsdiagnose
Triangel Bd. 12, Nr. 2, 57-67 (1973)

33. HOFF, F.:
Unspez. Abwehrvorgänge, unspez. Therapie
G. Thieme-Verlag, Stuttgart (1957)

34. HOWELL, R.R.:
The effects of colchicine of the matabolic accompaniments of phagocytosis
Arthr. and Rheumat. 8, 749-751 (1965)

35. INGLOT, A., DAVENPORT, F.M.:
Studies on the role of leukocytes in infection with influenza virus
J. Immunol. 88, 55-65 (1961)

36. ISHIBASHI, Y., YAMASHITA, T.:
Generation of a phagocytosis-stimulating factor by polymorphonuclear neutrophils during phagocytosis
Int. Arch. Allergy appl. Immun. 64, 181-189 (1981)

37. JACOBS, A.:
Phagocytosis in normal and anemic blood
J. clin. Path. 17, 185-187 (1964)

38. JACOBSTHAL, E.:
Über Phagozytoseversuche mit Myeloblasten, Myelozyten und eosinophilen Leukozyten
Virchows Arch. path. Anat. 234, 12-20 (1921)

39. JUNG, R.W.:
Correlation between number of leukocytes and percentage of phagocytosis
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 29, 981-983 (1932)

40. KARNOVSKY, M.L.:
Metabolic Basis of phagocytic activity
Phys. Rev., 146 (1962)

41. KARNOVSKY, M.L. SIMMONS, S., KARNOVSKY, M.J., GLASS, E.A., NOSEWORTHY, J.:
Comparative Studies on the metabolic basis of bactericidal activity in leukocytes
In: Phagocytic Mechanisms in Health and Disease
Ed. Williams, R.C. and Fudenberg, H.H., Georg Thieme-Verlag, Stuttgart (1972)

42. KLEBANOFF, S.J.:
The myeloperoxidase - mediated antimicrobial systems
In: Phagocytic Mechanisms in Health and Disease
Ed. Williams, R.C. and Fudenberg, H.H., Georg Thieme-Verlag, Stuttgart (1972)

43. KLEBANOFF, S.J.:
Iodination of bacteria: a bactericidal mechanism
J. Exp. Med. 126, 1063-1077 (1967)

44. KLEBANOFF, S.J.:
Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide antibacterial system
J. Bact. 95, 2131-2138 (1968)

45. KLEIHAUER, E.:
Der Granulozyt. S. 207-248
In: Hämatologie, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York (1978)

46. LEISHMAN, W.B.:
Note on a method of qualitatively estimating the phagocytic power of the leukocytes of the blood
Brit. med. J. 1, 73-75 (1902)

47. LÖVEI, E., LUDANY, G., VAJDA, J.:
Insulin und die Bakterienphagozytose der Leukozyten
Z. Vi Ho Fe 4, 533 (1952)

48. LUDANY, G., VAJDA, J., DÖKLEN, A. LI BOK NAM:
Die Wirkung des Chlorpromazins auf die Phagozytose der Leukozyten
Schweiz. med. Wschr. 86, Beiheft zu Nr. 37 (1956)

49. LUDANY, G., VAJDA, J., BACKHAUSZ, R.:
Vago-insuläres System und die Phagozytose d. Leukozyten
Arch. internat. pharmacodyn. thérap. 89, 279-291 (1952)

50. MATOTH, Y.:
Phagocytic and ameboid activities of the leukocytes in the newborn infant
Pediatrics 9, 748-755 (1952)

51. MARMONT, A., DAMASIO, E.:
The phagocytic response to the L.E. factor of leukocytes from chronic granulocytic and acute leukaemia
In: Current Research in Leukaemia. S. 16-22
Ed. F.G.J. Hayhoe. Cambridge University Press, London and New York (1965)

52. MARTIN, S.P., McKINNEY, G.R., GREEN, R.:
The metabolism of human polymorphonuclear leukocytes
Ann. N.Y. Acad. Sci. 59, 996-1002 (1955)

53. METCHNIKOFF, E.:
Sur la lutté des cellules de l'organisme contrel'invasion des microbes.
Ann. Inst. Pasteur 1, 321-336 (1887)

54. MILLER, M.E.:
Phagocytosis in the newborn infant: Humoral and cellular factors
J. Pediat. 74, 255-259 (1969)

55. MIYAMOTO, K.:
Phagocytic activity of leukocytes in premature infants
Part I. Comparison of the phagocytic activity of leukocytes between premature infants and full-term infants.
Hiroshima J. Med. Sci 14, 9-17 (1965)

56. MOLESCHOTT, J.:
Über das Verhältnis der farblosen Blutzellen zu den farbigen in verschiedenen Zuständen d. Menschen.
Wien. med. Wschr. 4, 113 (1854)

57. MUDD, S., MC. CUTCHEON, M., LUCKE, B.:
Phagocytosis
Phys. Rev. 14, 210-275 (1934)

58. MURPHY, P.:
Phagocytosis. In: The Neutrophil, S. 125-147
Plenum Publishing Corp. 1976, N.Y.

59. NEUMANN, G., KONORZA, G.:
Phagozytose und Nitroblau-Tetrazolium-Reduktion
Immunität u. Inf. 7, 21-23 (1979)

60. NEUFELD, F., RIMPAU, R.:
Über die Antikörper des Streptokokken- und Pneumokokken-Immunserums
Dtsch. med. Wschr. 30, 1458-60 (1904)

61. van OSS, C.J., GILLMAN, C.F., NEUMANN A.W.:
Phagocytic engulfment and cell adhesiveness
Marcel Dekker Inc., N.Y. und Basel (1975)

62. PENNY, R., GALTON, D.A.G., SCOTT, J.T., EISEN, V.:
Studies on neutrophil function. I. Physiological and pharmacological aspects.
Brit. J. Haemat. 12, 623-632 (1966)

63. PENNY, R., GALTON, D.A.G.:
Studies on neutrophil function. II. Pathological aspects
Brit. J. Haemat. 12, 633-645 (1966)

64. v. PHILIPSBORN, E.:
Weitere neue Erkenntnisse über das Verhalten der Leukozyten
Med. Mschr. 12, 100 (1958)

65. v. PHILIPSBORN, E.:
Untersuchungen über die Klebrigkeit der Leukozyten gesunder und kranker Menschen
Folia Haem. 41, 1 u. 2 (1930)

66. ROBINEAUX, R.:
Sur le rôle probable du complément dans la physiologie du leucocyte humain
Sem. hôp. Paris, S. 848 (1951)

67. SBARA, A.J., KARNOVSKY, M.L.:
The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes
J. biol. chem. 234, 1355-1362 (1959)

68. SCHILLING, V.:
Physiologie d. blutbildenden Organe
In: Bethes Handbuch der normalen und path. Physiologie
Bd. VI/2, S. 730, Springer, Berlin 1928

69. SIESS, M.:
Biologische und pharmakologische Beeinflussung der Leukozytenfunktion.
Zschr. ges. exp. Med. 120, 139-158 (1953)

70. STOSSEL, T.P., HARTWIG, J.H.:
Interaction of actin, myosin and a new actin-binding protein of rabbit pulmonary macrophage. II. Role of cytoplasmic movement in phagocytosis
J. Cell. Biol., 68, 602 (1976)

71. THOMALSKE, G.:
Untersuchungen über die Haftfähigkeit der Leukozyten
Diss. Marburg 1949

72. TISCHENDORF, W., FRITZE, E.:
Zur Aggregationsneigung der Leukozyten
Klin. Wschr. 27, 170-173 (1949)

73. TULLIS, J.L.:
The origin, properties, function and preservation of white blood cells.
In: Blood cells and plasma proteins. S. 257-280
Ed. J.L. Tullis, Acad. Press, N.Y. (1953)

74. TULLIS, J.L., SURGENOR, D.M.:
Phagocytosis promoting factor of plasma and serum
Ann. N.Y. Acad. Sci. 66, 386-390 (1956)

75. TYMPNER, K.-D.:
Die Bedeutung der Immunglobuline (IgM und IgA) für die Diagnose und Therapie in der Kinderheilkunde
Habil.schrift 1971, LMU München

76. TYMPNER, K.D., KLOSE., P.K., JANKA, G.:
Einfluß intravenös verträglicher Immunglobuline auf die Phagozytose-Leistung der Granulozyten in vitro
Münchner Med. Wschr. 8, 251-252 (1978)

77. TYMPNER, K.D., MEYER, G., NEUHAUS, F., SANGUANSERMSRI,T.:
Chron. Infektion mit Staphylococcus aureus b. verminderter intracellulärer Bakterienabtötung
Mschr. Kinderheilk. 121, 202-203 (1973)

78. UNGER, P.:
Studies of phagocytosis
Proc. of the Xth Congress of the European Society of Haematology, Strassbourgh, 1965. S.A. Karger, Basel

79. VAUGHAN, R., BOYDEN, S.V.:
Interactions of macrophages and erythrocytes
Immunology 7, 118-125 (1964)

80. WARD, P.A.:
Chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes
Biochem. Pharmacol. Suppl. S. 99-105 (1968)

81. WEHINGER, H.:
Latex Phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes.
Europ. J. Pediat. 123, 125-132 (1976)

82. WHITE, R.G.:
Immunological functions of lympho-reticular tissues.
In: Clinical aspects of immunology, S. 213-245.
Blackwell Scientific Publications, Oxford (1963)

83. WRIGHT, C.S., DODD, M.C.:
Phagocytosis
Ann. N.Y., Acad. Sci. 59, 945-950 (1955)

84. WRIGHT, A.E., DOUGLAS, S.D.:
An experimental investigation of the role of the blood fluids in connection with phagocytosis
Proc. Roy. Soc. London 72, 357-370 (1904)

85. WRIGHT, A.E., DOUGLAS, S.R.:
Opsonic power of human blood in its relation to the bacillus typhosus and the cholera vibrio
Proc. Roy. Soc. London 73, 136-142 (1904)

86. ZUCKER-FRANKLIN, D., HIRSCH, J.G.:
Electron microscope studies on the degranulation of rabbit peritoneal leukocytes during phagocytosis.
J. exp. Med. 120, 569-576 (1964)

LEBENSLAUF

Am 3.7.1949	wurde ich in Schirmitz/b. Weiden geboren. Ich wuchs mit meiner Schwester im Hause unserer Eltern, dem Malermeister Georg Hagn und seiner Ehefrau Katharina, geb. Bäumler, auf.
1955 - 1961	Volksschule in Weiden
1961 - 1965	Realschule in Weiden Abschluß: Mittlere Reife
1965 - 1969	Städt. Sprachen- u. Dolmetscherinstitut in München Abschluß: Diplom in Engl. und Franz.
1969 - 1973	Tätigkeit als Dolmetscherin und Übersetzerin - parallel Städt. Abendgymnasium München Abschluß: Abitur
1973 - 1974	Studium der Physik an der Ludwig Maximilians-Universität München
1974 - 1980	Studium der Medizin an der Ludwig Maximilians-Universität München Abschluß: Staatsexamen
1981 - 1982	Assistenzärztin der Reha-Klinik in Bad Wiessee
Seit 1983	Assistenzärztin auf der Inneren Abteilung des Kreiskrankenhauses Nabburg
Berufsziel:	Facharztanerkennung für Innere Medizin